

PRODUZIONE DI BIOETANOLO DA BIOMASSE PROVENIENTI DA SITI DI FITODEPURAZIONE NELL' AMBITO DEL PROGETTO FITOPROBIO

R. ALBERGO, A. AMBRICO, R. BALDUCCHI, O. MACCIONI, S. PALAZZO, M. TRUPO

ENEA - Laboratorio Biotecnologie
Centro Ricerche Trisaia, Matera



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

PRODUZIONE DI BIOETANOLO DA BIOMASSE PROVENIENTI DA SITI DI FITODEPURAZIONE NELL' AMBITO DEL PROGETTO FITOPROBIO

R. ALBERGO, A. AMBRICO, R. BALDUCCHI, O. MACCIONI, S. PALAZZO, M. TRUPO

ENEA - Laboratorio Biotecnologie
Centro Ricerche Trisaia, Matera

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

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

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

PRODUZIONE DI BIOETANOLO DA BIOMASSE PROVENIENTI DA SITI DI FITODEPURAZIONE NELL' AMBITO DEL PROGETTO FITOPROBIO

R. ALBERGO, A. AMBRICO, R. BALDUCCHI, O. MACCIONI, S. PALAZZO, M. TRUPO

Summary

During the project FITOPROBIO, new potential wetland plants were studied to obtain second generation ethanol. The plants were irrigated with wastewater which could be an interesting opportunity of the reuse of poor quality waters and the development of the marginal areas.

The agronomic activities took place in two experimental fields (Veneto and Sicily). Twentythree species were characterized in terms of elements and fiber in order to find the best potential ethanol producers. A three-step chemical pretreatment was carried out on bench scale for all the 23 species. First the biomasses were treated with hot diluted acid (H_2SO_4 2%, $T=80^\circ C$, $t=24h$), secondly with diluted NaOH 1% at $40^\circ C$ for 24h, finally concentrated H_2O_2 was added until the 1% concentration at $t=25^\circ C$ for 24h. After the chemical pretreatment until the 90% of cellulose was recovered and the 80% of lignin was solubilised. This pretreated material was then hydrolysed with a mix of commercial enzymes (Celluclast 1.5L and Novozym 188) for 72h and afterwards fermented for 24h by means of strain of *Saccharomyces cerevisiae* isolated in the ENEA laboratories. For each studied plant the yield of ethanol production was calculated. At the end, the best experiments were scaled-up on bioreactors of the volume of 2/5 liters.

Keywords: constructed wetlands, wastewater, lignocellulosic, biomass, pretreatment, hydrolysis, bioethanol.

Riassunto

Durante il progetto FITOPROBIO, sono state studiate nuove piante palustri per ottenere etanolo di seconda generazione. Le piante sono state irrigate con acque di scarico che potrebbero rappresentare un'opportunità interessante riguardo al riutilizzo di acque di scarsa qualità e allo sviluppo di zone marginali. Le attività agronomiche sono state svolte in due campi sperimentali (Veneto e Sicilia). Ventitré specie sono state caratterizzate in termini di elementi e fibra in modo da trovare le specie potenzialmente migliori alla produzione di etanolo. È stato sperimentato un pretrattamento chimico di tre fasi, su scala banco per tutte le 23 specie. Dapprima, le biomasse sono state trattate con acido diluito a caldo (H_2SO_4 2%, $T=80^\circ C$, $t=24h$), in seguito con NaOH 1% diluito alla temperatura di $40^\circ C$ per 24 ore, infine H_2O_2 concentrato è stato aggiunto fino alla concentrazione dell'1% a $t=25^\circ C$ per 24 ore. Dopo il pretrattamento chimico, è stato recuperato fino al 90% di cellulosa e l'80% di lignina è stata solubilizzata. Il materiale pretrattato è stato idrolizzato con un mix di enzimi commerciali (Celluclast 1.5L e Novozym 188) per 72 ore e in seguito fermentato per 24 ore utilizzando un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* isolato nei laboratori dell'ENEA. Per ogni pianta studiata, è stata calcolata la resa di produzione dell'etanolo. Infine, i migliori esperimenti sono stati replicati in bioreattori del volume di 2/5 litri.

Parole chiave: fitodepurazione, acque reflue, lignocellulosico, biomassa, pretrattamento, idrolisi, bioetanolo

INDICE

1. Sintesi del progetto FITOPROBIO	pag. 7
2. Obiettivi U.O. UTTRI-BIOTEC	pag. 13
3. Materiali e metodi	pag. 25
4. Risultati e discussione	pag. 38
5. Conclusioni	pag. 72
6. Bibliografia	pag. 75

1. SINTESI DEL PROGETTO FITOPROBIO

La produzione di biomasse ligneo-cellulosiche destinate alla trasformazione in etanolo per l'ottenimento di energia può rappresentare un'interessante prospettiva per lo sviluppo di aree marginali e utilizzare acque reflue di scarsa qualità. Si otterrebbero così i presupposti di una produzione energetica decentrata e di valorizzazione di corpi idrici che altrimenti potrebbero richiedere trattamenti di finissaggio qualitativo. In questo contesto, è indispensabile far ricorso a sistemi di coltivazione estensivi, che utilizzino piante vigorose, rustiche e di elevata produttività. Bassi costi, elevate produttività, vicinanza fra luoghi di produzione e centrale di utilizzazione sono i presupposti affinché tale tipo di filiera possa svilupparsi con successo. E' opportuno orientare la scelta verso piante perenni, in modo da non dover sostenere ogni anno i costi delle operazioni di lavorazione e di semina. Fra le specie potenzialmente idonee, particolarmente interessanti appaiono alcune palustri, obbligate o facoltative, o alcune piante arboree adatte a vivere in condizioni di elevata umidità, anche perché potrebbero contribuire ad un miglioramento qualitativo delle acque reflue utilizzate per la loro coltivazione.

Il progetto si propone quindi di valutare la fattibilità e la sostenibilità agronomico-ambientale ed energetico-economica della produzione di biomasse ottenibile da piante *no food* utilizzabili nei processi di fitodepurazione. Esso ha quindi il duplice scopo di favorire lo sviluppo e l'applicazione di tecniche di fitodepurazione delle acque, offrendo la possibilità di impiegare piante con una destinazione economica, e di contribuire all'allestimento di filiere produttive di energie alternative rinnovabili a basso costo di produzione. In particolare, il progetto si occuperà della produzione di biomasse cellulosiche da destinare alla produzione di bioetanolo e prenderà in considerazione sia la fase di coltivazione che quella di valorizzazione energetica.

Esso è stato sviluppato da tre partner che hanno operato in stretta sinergia indicati come unità operativa (U.O.):

U.O. n° 1, Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, risorse Naturali e Ambiente dell'Università di Padova (DAFNAE-UNIPD) il cui responsabile scientifico è il prof. M. Borin che è anche il coordinatore del progetto;

U.O. n° 2, CSEI Catania (CSEI-CT) Centro Studi di Economia applicata all'Ingegneria il cui responsabile scientifico è il prof. S. Barbagallo;

U.O. n° 3, Laboratorio Biotecnologie UTTRI-BIOTEC Centro Ricerche Trisaia ENEA il cui responsabile scientifico è il dott. R. Albergo.

Le U.O. DAFNAE-UNIPD e CSEI-CT hanno sviluppato esperienze pilota con sistemi di fitodepurazione in ambienti e con piante diverse, in modo da analizzare e presentare differenti soluzioni di riferimento per realtà agricole del Nord e del Sud Italia. Esse hanno selezionato le specie in collaborazione con le indicazioni dei ricercatori UTTRI-BIOTEC, e hanno condotto i processi produttivi in campo per ottenere le biomasse fermentescibili. Queste sono state consegnate all'U.O. ENEA che ha la caratterizzazione delle biomasse nonché le prove di pretrattamento idrolisi e fermentazione

Nei primi mesi le U.O. hanno collaborato per individuare assieme le piante di maggiore interesse, definire i protocolli di lavoro e il piano delle attività.

Successivamente sono stati realizzati i dispositivi sperimentali da parte di DAFNAE-UNIPD e CSEI-CT costituiti sia da impianti di fitodepurazione operanti a scala reale, sia da prototipi e/o reattori di piccole dimensioni e si è proceduto alla messa a dimora delle piante.

Dal sesto mese è iniziato il monitoraggio delle prestazioni depurative e della crescita delle piante. Sono stati prelevati campioni di vegetazione a diversi stadi di sviluppo che sono stati inviati a UTTRI-BIOTEC per le prove di laboratorio.

Il progetto rientra nel quadro di potenziamento delle filiere bioenergetiche, come previsto da diversi documenti di programmazione comunitaria e nazionale. Lo stesso Parlamento Europeo ha recentemente rilevato i vantaggi che il ricorso alla bioenergia offre, non solo rispetto alle fonti energetiche convenzionali, ma anche nei confronti delle altre energie rinnovabili: costi relativamente contenuti, minore dipendenza alle variabili atmosferiche ed ambientali e conseguente maggiore programmabilità, sviluppo di strutture economiche locali e possibilità di fonti alternative di reddito per il settore agricolo.

La produzione di bioenergia è sostenuta dalla riforma della Politica Agricola Comunitaria attuata nel 2003 (Regolamento comunitario 1782/2003) in cui il sostegno al reddito degli agricoltori non è più vincolato alla produzione agricola. Gli agricoltori possono quindi rispondere liberamente alla crescente domanda di biomassa e beneficiare dello speciale regime di "aiuto alle colture energetiche".

Nel Documento di Programmazione Economico-Finanziaria 2007-2011, il Governo interviene con decisione, valorizzando le risorse interne, promuovendo le fonti rinnovabili in maniera efficiente e secondo logiche di filiera industriale. Tra le fonti rinnovabili, grande rilevanza è già stata poi riservata alle "Agro-energie", che dovranno essere favorite attraverso il rafforzamento delle potenzialità della L. 81/2006.

Nell'ambito della recente approvazione del Documento di Programmazione Economico Finanziaria per gli anni 2007-2011, la Regione del Veneto ha posto tra le priorità lo sviluppo di

una strategia diretta a contenere la dipendenza del nostro Paese per quanto concerne l'approvvigionamento energetico. I problemi inerenti le strategie energetiche prossime e future s'intrecciano con l'impegno, assunto dall'Italia, nell'ambito della ratifica del cosiddetto "Protocollo di Kyoto", a ridurre, nel periodo 2008-2012, del 6,5% le emissioni di gas clima alteranti (responsabili del c.d. "effetto serra") rispetto al livello del 1990. Stime recenti indicano ancora lontano l'obiettivo sottoscritto dal nostro Paese.

Per il settore primario lo sviluppo della filiera bioenergetica (più delle altre fonti energetiche alternative) è divenuta ancor più interessante per il rafforzamento sul mercato delle aziende agricole e forestali; in particolare, in seguito ad una serie di agevolazioni fiscali e autorizzative previste da recenti provvedimenti normativi statali, l'interesse per la produzione di energia è decisamente aumentato. In successione, legge finanziaria dello Stato per il 2006 (L. 266/2005), legge 81/2006 (c.d. "decretosull'aviararia", appunto convertito in legge) e, ultimo, nuovo testo unico sull'ambiente (D. Lgs. 152/2006), hanno posto le basi per la produzione dell'energia all'interno dell'azienda agricola.

La crescente diffusione di sistemi di fitodepurazione di acque reflue di varia origine, la necessità di gestire la vegetazione di aree umide naturali e di superfici destinate alla laminazione delle piene, le periodiche operazioni di manutenzione della chilometrica rete di canali di bonifica unite alla sempre presente opportunità di trovare nuove prospettive per la coltivazione di terreni marginali possono originare la disponibilità di ingenti quantitativi di biomasse erbacee la cui destinazione può risultare problematica. L'utilizzazione di tali biomasse fermentazione per l'ottenimento di energia tramite fermentazione può pertanto rappresentare un'interessante prospettiva per lo sviluppo rurale e per trovare impiego ad acque reflue di scarsa qualità. Si otterrebbero così i presupposti di una produzione energetica decentrata e di valorizzazione di corpi idrici che altrimenti potrebbero richiedere trattamenti di finissaggio qualitativo.

La trasformazione delle biomasse ligneo-cellulosiche in etanolo prevede tre passaggi fondamentali: pretrattamento della biomassa (chimico o fisico) mediante il quale si cerca di rompere la struttura cristallina della cellulosa e renderla così cellulosa ed emicellulosa all'attacco degli enzimi; idrolisi enzimatica rivolta alla trasformazione di cellulosa ed emicellulosa in zuccheri fermentabili; fermentazione che sfrutta la capacità di alcuni microorganismi (i lieviti) che sono capaci di trasformare gli zuccheri prodotti durante l'idrolisi in etanolo.

Le biomasse erbacee sono materiali tipicamente deperibili, con basse densità, il che implica problematiche operazioni di trasporto, stoccaggio e pre trattamento. La loro utilizzazione, quindi, passa attraverso la presenza dell'impianto di trasformazione nel raggio di 5-6 chilometri dai siti di coltivazione. Tutto questo, d'altronde, comporta il vantaggio di rivolgersi verso un tipo di produzione che corre scarsi rischi di subire la concorrenza di altri Paesi.

In questo contesto, è indispensabile far ricorso a sistemi di coltivazione estensivi, che utilizzino piante vigorose, rustiche e di elevata produttività. Bassi costi, elevate produttività sono i presupposti affinché tale tipo di filiera possa svilupparsi con successo. E' opportuno orientare la scelta verso piante erbacee perennanti, in modo da non dover sostenere ogni anno i costi delle operazioni di lavorazione e di semina. Fra le specie potenzialmente idonee, particolarmente interessanti appaiono alcune palustri, obbligate o facoltative, anche perché potrebbero contribuire ad un miglioramento qualitativo delle acque reflue utilizzate per la loro coltivazione.

Fra le queste, è interessante valutare prestazioni e potenzialità offerte dalla canna palustre (*Phragmites australis*), una graminacea rizomatosa, con culmo eretto, cavo e nodoso, con diametro di circa un centimetro, altezza media sui 2-3 metri. I culmi molto fitti (50-200 per m²) e l'imponente apparato ipogeo composto da radici, rizomi e stoloni, conferiscono a questa specie una grande potenzialità competitiva verso gli altri vegetali e una notevole capacità produttiva di biomassa. Vive bene anche in acque fortemente eutrofizzate dalla quale estrae i fitonutrienti e altri inquinanti. Alla fine della stagione vegetativa, la canna può raggiungere produzioni di 25-35 t/ha di sostanza secca. E' una specie molto diffusa negli ambienti umidi naturali, dove la sua gestione risulta spesso problematica in quanto ci si trova di fronte alla scelta di tagliare e raccogliere periodicamente la vegetazione, ovvero di lasciare sul sito la biomassa prodotta. Mentre la seconda ipotesi rispetterebbe maggiormente i canoni della naturalità, ma inevitabilmente andrebbe a determinare una progressiva occlusione dell'ambiente umido, la prima si scontra spesso con la oggettiva difficoltà di allocare le ingenti masse di vegetazione raccolta. Problematiche analoghe si incontrano nelle zone di bonifica, dove la canna palude si insedia e si sviluppa rigogliosamente negli scoli di diverso ordine. A ciò si aggiunge che la stragrande maggioranza degli impianti di fitodepurazione è vegetata con canna palustre e questo amplia ulteriormente la disponibilità di materiale vegetale. Abbinando la fitodepurazione alla produzione di biomasse con finalità energetiche si attuerebbe quindi un processo virtuoso di fitodepurazione produttiva.

Un piano di gestione della canna palustre, sia negli ambienti naturaliformi che in quelli gestiti, non può prescindere dalle possibilità concrete di utilizzo delle produzioni raccolte e a tal fine vanno studiate possibilità e problematiche della destinazione energetica.

Accanto alla canna palustre, altre specie possono offrire interessanti potenzialità, data la loro notevole produttività e capacità di avvantaggiarsi dell'apporto di acque reflue, quali, ad esempio *Arundo donax L.*, *Typha latifolia L.*, *Miscanthus giganteum Anderss.*, *Glyceria maxima (Hartman) Holmb.*, *Canna indica L.*, *Phalaris arundinacea L.*, *Symphytum asperrimum L.* La coltivazione delle specie palustri presenta una serie di problematiche da affrontare con la ricerca, in quanto si tratta di piante spontanee, assolutamente sconosciute per ciò che concerne l'individuazione delle specie adatte, i metodi di coltivazione e di raccolta, la loro produttività, la resa in etanolo. In particolare, per la produzione di etanolo sono idonee biomasse con scarso contenuto di lignina e quindi va attentamente valutata la variazione della composizione chimica delle specie nel corso del ciclo biologico, in modo tale da individuare il momento ottimale per la raccolta. Tagli anticipati, con biomasse fresche, potrebbero essere più idonei rispetto a quelli tardivi, quando molte specie tendono a significare gli steli. D'altronde, la biologia delle palustri è caratterizzata da una fase di sintesi estiva e di traslocazione degli assimilati agli organi ipogei a partire da fine estate inizio autunno. Tagli anticipati potrebbero pertanto privare la pianta delle sostanze di riserva che vengono poi mobilizzate nella primavera successiva a supportare la ripresa vegetativa. Conseguenza che il ritmo di utilizzazione deve essere attentamente individuato cercando il giusto compromesso fra produttività, attitudine alla trasformazione in etanolo e mantenimento nel tempo del vigore vegetativo della piantagione.

Obiettivo generale del progetto è la valutazione della produttività e della attitudine alla trasformazione in etanolo di biomasse erbacee provenienti da piante palustri impiegabili nella fitodepurazione, in modo da abbinare tecniche di depurazione naturale delle acque reflue alla produzione di energie rinnovabili attraverso un sistema decentralizzato.

Il traguardo viene perseguito attraverso i seguenti obiettivi specifici:

- individuazione delle specie di maggiore interesse potenziale, che sappiano abbinare efficienza depurativa, produttività, resa in etanolo;
- valutazione dell'efficienza del trattamento delle acque reflue urbane e zootecniche con sistemi di fitodepurazione in rapporto sia ai limiti dettati dal D.Lgs. 152/2006, per lo scarico su corpo idrico superficiale, che a quelli previsti dal D.M. 185/2003 per il riutilizzo a scopo irriguo dei reflui depurati;
- valutazione del contributo, nei processi di depurazione, di alcune specie di piante erbacee scelte sia tra quelle comunemente impiegate (es. *Phragmites australis*, *Typha latifolia*) sia fra

quelle scarsamente o per nulla utilizzate, ma potenzialmente idonee (es. *Arundo donax*, *Mischantus giganteus*, *Cynara cardunculus*, *Panicum virgatum*, *Saccharum spontaneum*, *Vetiveria zizanioides*, *Cyperus papyrus*);

- analisi della risposta bio-agronomica di diverse specie erbacee impiegate nei sistemi di fitodepurazione per la produzione di bioetanolo di seconda generazione;
- valutazione dell'effettiva sostenibilità delle diverse colture testate in relazione alle specifiche condizioni impiantistiche, climatiche ed economiche;
- messa a punto delle tecniche gestionali delle piante al fine di ottenere materiali idonei alla fermentazione, con particolare riferimento all'epoca e alla frequenza dei tagli;
- sperimentazione di pretrattamento chimico in condizioni *mild*. Massimizzazione del recupero di cellulosa fino al 90% di cellulosa allontanando fino all'80% di lignina.
- ottimizzazione della idrolisi enzimatica ottimizzando i parametri di reazione nonché il dosaggio enzimatico al fine di idrolizzare circa l'80% di cellulosa.
- sperimentazione di un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* originale ENEA resistente ad alte concentrazioni di etanolo (fino al 17%) e particolarmente efficiente sia in termini di velocità di fermentazione che in termini di resa finale di etanolo ottenuto. Poiché i laboratori UTTRI-BIOTEC sono dotati di fermentatori che vanno dalla scala banco (del volume compreso tra 2 e 5 litri) fino alla scala pilota (del volume compreso tra 15 e 500 litri) per il disegno sperimentale che si sarà rivelato migliore in termini di resa di bioetanolo sarà vagliata la possibilità di eseguire lo scaling-up del processo.
- valutazioni multi-attributo di filiera tramite Life Cycle Assessment (LCA).

2. OBIETTIVI U.O. UTTRI-BIOTEC

2.1 INTRODUZIONE

2.1.1 Le biomasse

Quando si parla di biomassa ci si riferisce ad una grande varietà di materiali di natura organica ed estremamente eterogenea di origine vegetale.

Essa rappresenta la forma più sofisticata di immagazzinamento e trasformazione dell'energia solare sotto forma di energia chimica. Mediante la fotosintesi infatti le piante sono in grado di convertire l'anidride carbonica presente nell'atmosfera in materia organica durante le fasi di crescita della piante. E' stato stimato che mediante questo processo sono fissate circa 2×10^{11} tonnellate di carbonio per anno che corrispondono a circa 70×10^3 Mtep (Fiorese *et al.*, 2006). Poiché la biomassa, attraverso il processo di fotosintesi, cattura l'energia solare e la trasforma in energia chimica rappresenta una fonte rinnovabile e inesauribile per la produzione di altre forme di energia.

Le biomasse possono essere utilizzate per fini energetici sia direttamente come combustibili sia indirettamente trasformandole in combustibili solidi, liquidi o gassosi.

La Direttiva Europea 2009/28/CE definisce la biomassa come "la frazione biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui di origine biologica provenienti dall'agricoltura (comprendente sostanze vegetali e animali), dalla silvicoltura e dalle industrie connesse, comprese la pesca e l'acquacoltura, nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani"

Possono essere quindi considerati come biomasse:

- i sottoprodotti delle produzioni erbacee, arboree e delle prime operazioni agroindustriali;
- i sottoprodotti delle operazioni forestali, della produzione di legname da opera e della lavorazione del legno;
- le culture, sia arboree che erbacee, destinate specificatamente alla produzione di biocarburanti e biocombustibili;
- i reflui zootecnici destinati alla produzione di biogas;
- la parte organica dei rifiuti organici;
- i residui inutilizzabili di produzioni destinate all'alimentazione umana ed animale.

L'uso energetico delle biomasse prevede diverse tecniche e filiere di conversione energetica che dipendono dalle caratteristiche chimico fisiche della biomassa utilizzata e per i principi fisici applicabili per la conversione energetica. Si possono quindi distinguere tre tipologie di processi:

- termochimici ovvero combustione, pirolisi, gassificazione e liquefazione;
- bio-chimici ovvero digestione e fermentazione;
- estrazione meccanica: esterificazione

In particolar modo, in questa parte del progetto FITOPROBIO, ci si è occupato di un particolare aspetto di processo di conversione energetica di tipo biochimico della produzione di etanolo per via fermentativa di biomasse lignocellulosiche (etanolo di seconda generazione). A differenza della produzione dell'etanolo di prima generazione che avviene grazie alla fermentazione degli zuccheri derivanti dall'idrolisi dell'amido o direttamente estratti da colture come barbabietola o canna da zucchero, l'etanolo da biomasse lignocellulosiche ha bisogno di un passaggio preliminare, ovvero di un pretrattamento che renda la biomassa accessibile agli enzimi necessari a convertire la cellulosa in glucosio. Il glucosio così prodotto può essere quindi fermentato e trasformato in alcol da microrganismi (in genere lieviti) che lavorano in condizione anaerobiche. (Paoli, 2001).

2.1.2 La biomassa lignocellulosica

La biomassa lignocellulosica è la risorsa rinnovabile più abbondante del pianeta e consiste in un complesso polimerico di diversi zuccheri. (Saratale *et al.*, 2012). Le componenti principali della biomassa lignocellulosica sono l'emicellulosa, la cellulosa e la lignina che per la sua struttura complessa è estremamente resistente agli attacchi enzimatici.

L'emicellulosa è costituita da catene corte e ramificate di etropolisaccaridi contenenti principalmente zuccheri pentosi ma anche esosi (Saha, 2000) e mediamente costituisce il 25-35% della biomassa lignocellulosica. Gli zuccheri contenuti nell'emicellulosa sono pentosi il come D-xilosio e L-arabinosio ma anche esosi come il D-mannosio, il D-glucosio ed il D-galattosio che vanno a costituire le corte e ramificate catene di oligopolisaccaridi dell'emicellulosa mediamente con 500-3000 unità. La composizione chimica dell'emicellulosa generalmente dipende dal materiale vegetale, dalla fase e dalle condizioni di crescita (Niehaus *et al.*, 1999). Il maggior componente della emicellulosa è lo xilano che è costituito da una

catena polimerica di D-xilosio e dai sostituenti costituiti da molecole di acido 4-O-metil-D-glucuronico, L-arabinosio e gruppi acetilici. Nelle piante erbacee e nei cereali, lo xilano contiene unità di L-arabinosio legate come una singola unità sostituyente al polimero di D-xilosio (Romanowska *et al.*, 2006). Il ruolo dello xilano è quello di fornire una struttura di coesione tra lignina e cellulosa (Fan *et al.*, 1987) attraverso legami covalenti tra le estremità fenoliche della lignina ed i suoi gruppi arabinosilici e glucuronosilici. Lo xilano e quindi l'emicellulosa gioca un ruolo di coesione nella struttura della pianta contribuendo insieme alla lignina a proteggere la cellulosa dagli attacchi enzimatici. (Rabinovich *et al.*, 2002).

La cellulosa può essere rappresentata con la formula $(C_6H_{10}O_5)_n$ ed a differenza dell'emicellulosa è un polimero lineare di glucosio. I monomeri di glucosio sono legati tra loro da legami $\beta(1-4)$ glicosidici. La cellulosa è insolubile in acqua ed è resistente agli attacchi enzimatici a causa della sua struttura fortemente impaccata, altamente cristallina e con una grande resistenza alla trazione. (Demien *et al.*, 2005). I gruppi idrossilici sui residui di glucosio in catena di cellulosa formano legami ad idrogeno con le molecole di ossigeno sulla stessa catena o sulle catene vicine mantenendo le stesse catene fortemente legate le une alle altre formando le cosiddette microfibrille che danno alla struttura enorme compattezza (Fig. 1). Le fibrille sono raggruppate fra loro in gruppi di circa 30 catene individuali di cellulosa e circa 100 microfibrille sono impaccate tra loro per formare le fibrille e le fibrille a loro volta sono impaccate tra loro per formare le fibre di cellulosa (Brown *et al.*, 2000). E' stato osservato che il grado di cristallinità della cellulosa dipende dalla sua origine e che la percentuale di cellulosa cristallina può variare tra il 30 ed il 70%. La restante parte è cellulosa amorfa che è degradata molto più velocemente della cellulosa cristallina ed è meno resistente agli attacchi enzimatici (Zhang *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008).

La lignina è essenzialmente un polimero tridimensionale di molecole di fenil-propano legate fra loro da differenti tipi di legame che includono legami alchile-arile, alchile-alchile ed arile-arile in eteri (Kumar *et al.*, 2008). La composizione della lignina differisce con la specie della pianta, con i tessuti e con la sua posizione all'interno della parete cellulare. La sua composizione può variare anche in base al posto in cui la pianta è cresciuta, al clima, alla luce solare ed alla età della pianta (Crawford, 1981). Essa riempie gli spazi nella parete cellulare delle piante tra cellulosa, emicellulosa e pectine ed è legata mediante legami covalenti all'emicellulosa ed a diversi polisaccaridi conferendo così alle pareti cellulari resistenza meccanica e rigidità strutturale mantenendo insieme le fibre di polisaccaride (Fromm *et al.*, 2003).

A differenza della cellulosa la lignina ha una natura amorfa.

La concentrazione più alta di lignina nella pianta si ha nella lamella mediana ma è anche abbondante nelle pareti secondarie di alcune piante vascolari (Kapdan *et al.*, 2006).

A causa della sua insolubilità in acqua è abbastanza difficile per i microrganismi penetrare in essa ed iniziare a degradarla. La lignina inoltre è resistente agli acidi ma può essere solubilizzata in soluzioni alcaline.

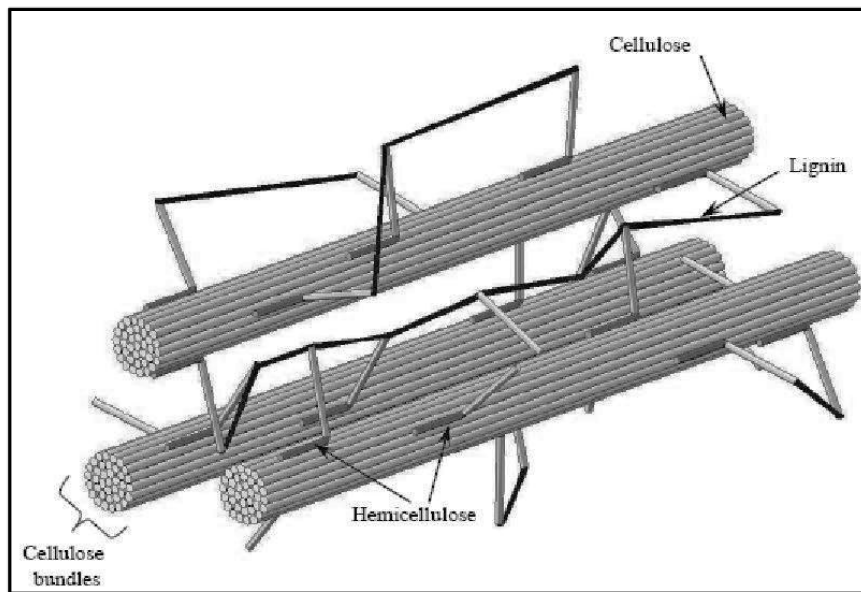


Figura. 1. Posizione delle microfibrille di cellulose nelle pareti cellulari. (Murphy and McCarthy, 2005).

2.1.3 Panoramica sul processo di produzione di etanolo da biomassa lignocellulosica

La produzione di etanolo da biomassa lignocellulosica comprende i seguenti passaggi: pretrattamento, idrolisi, fermentazione.

Il pretrattamento è un passaggio preliminare e necessario all'idrolisi dei materiali lignocellulosici in monosaccaridi fermentabili in quanto senza un adeguato pretrattamento l'idrolisi risulterebbe un passaggio complicato poiché la digeribilità della cellulosa è ostacolata dalla natura chimico-fisica e strutturale dei reticoli di lignina ed emicellulosa (Alvira *et al.*, 2010). A causa di questi fattori strutturali il pretrattamento è un passaggio essenziale per ottenere zuccheri fermentabili nella successiva fase dell'idrolisi. Lo scopo del pretrattamento è quindi quello di rompere la struttura della lignina (figura 2), allontanare eventualmente l'emicellulosa e disgregare la struttura cristallina della cellulosa per aumentare l'accessibilità degli enzimi durante la fase dell'idrolisi (Monsier *et al.*, 2005a).

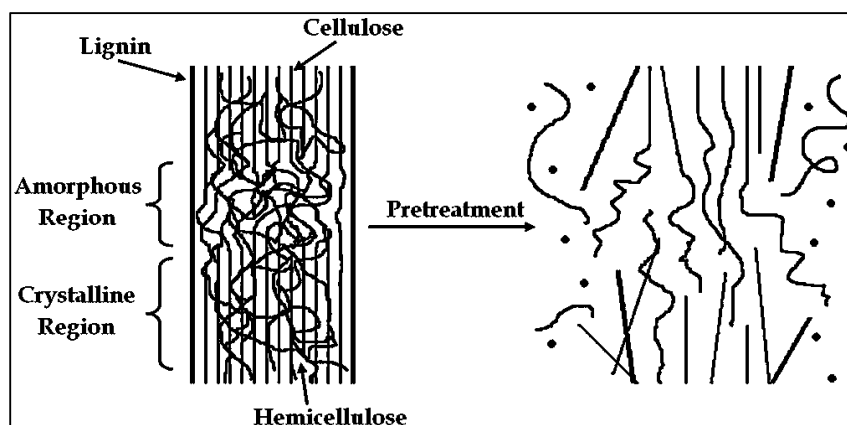


Figura 2. Effetto del pretrattamento sulla biomassa lignocellulosica.

Diversi sono i fattori da prendere in considerazione per la scelta di un pretrattamento che sia economico ed efficiente (Yang e Wyman, 2008).

Deve produrre alte rese per un gran numero di specie e diversi tempi di raccolta; produrre un solido altamente digeribile a quantità di enzima quanto più basse possibile; non produrre una degradazione significativa degli zuccheri fermentabili ottenendone una elevata concentrazione; produrre minime quantità di composti tossici all'idrolisi ed alla fermentazione; essere efficace ad alte concentrazioni di materia secca; eventualmente recuperare alcuni costituenti che

possono essere trasformati in sottoprodotti dal valore aggiunto; utilizzare reattori a basso costo ed infine richiedere minime quantità di calore ed energia.

Nella tabella 1 sono riassunti i principali vantaggi e svantaggi dei più comuni pretrattamenti sulla struttura dei materiali lignocellulosici.

Una volta che la biomassa è stata pretrattata il passaggio successivo è costituito dall'idrolisi enzimatica della cellulosa. L'idrolisi enzimatica è condotta in genere da un miscuglio di enzimi che idrolizzano la cellulosa (sia cristallina che amorfa) in zuccheri fermentabili (Duff and Murray, 1996)

Pretrattamento	Vantaggi	Svantaggi
Biologico	Degradazione lignina ed emicellulosa, basso consumo energetico	Bassa velocità di idrolisi
Macinazione	Riduce la cristallinità della cellulosa	Alto consumo di energia
Steam explosion	Idrolisi della cellulosa e trasformazione della lignina, conveniente	Formazione di composti tossici, degradazione della cellulosa
AFEX	Aumenta l'area superficiale accessibile,, bassa formazione di composti tossici ed inibitori	Applicabile a biomasse con basso contenuto di lignina, costo dei reagenti (ammoniaca)
CO2 explosion	Aumenta l'area superficiale accessibile, bassa formazione di composti tossici ed inibitori, convenienza	Processo ad alte pressioni
Agenti ossidanti	Aumenta l'area superficiale accessibile, rimuove lignina ed emicellulosa, bassa richiesta energetica	Costo dei reagenti
Ozonolisi	Riduce il contenuto di lignina, non implica formazione di composti tossici	Alto costo dell'ozono
Solventi organici	Trasformazione della lignina e dell'emicellulosa	Alto costo dei solventi che devono essere drenati e riciclati
Acidi concentrati	Alta percentuale di recupero del glucosio, condotto a temperatura ambiente	Corrosione degli impianti, utilizzo di grosse quantità di acido che deve essere riciclato, formazione di inibitori
Acidi diluiti	Aumenta l'area superficiale accessibile, rimuove lignina ed emicellulosa, minori problemi di formazione di inibitori e	Minore concentrazione di zuccheri nel flusso uscente, costo dei reagenti.
Alcali	Trasformazione della lignina, solubilizzazione dell'emicellulosa, aumento della superficie accessibile agli enzimi, possono essere condotti a temperatura ambiente	Tempi di residenza lunghi, applicabile per biomasse a non elevato contenuto di lignina.

Tabella 1. Vantaggi e svantaggi di differenti metodi di pretrattamento per la biomassa lignocellulosica (Alvira *et al.* 2010, Saratale *et al.*, 2012).

La formazione di zuccheri fermentabili dalla cellulosa è la risultante dell'azione coordinata delle diverse componenti di un enzima come le β -endoglucanasi, le β -exoglucanasi and β -D-glucosidasi negli enzimi cellulasi (Bhat and Bhat, 1997; Lynd *et al.*, 2002). Questo tipo di enzimi sono generalmente prodotti da funghi come *Trichoderma*, il *Penicillium* e l'*Aspergillus*. Le endoglucanasi agiscono rompendo i legami β -1,4 glucosidici in maniera casuale producendo catene più corte di oligosaccaridi. Le exoglucanasi invece sulle estremità accessibili delle molecole di oligosaccaridi producendo molecole di glucosio e cellobiosio. Infine le β -D-

glucosidasi agiscono sulle molecole di cellobiosio o altre cellodestrine rilasciando molecole di glucosio.

L'azione delle β -D-glucosidasi gioca un ruolo molto importante nella fase di idrolisi poiché il cellobiosio essendo il prodotto finale dell'azione delle cellulasi ne inibisce l'azione (Mandels and Reese, 1963; Stanberg *et al.*, 1977). Alla stessa maniera l'attività delle β -D-glucosidasi è inibita dal glucosio (Holtzapple *et al.*, 1990). Poiché quindi gli enzimi sono inibiti dai prodotti finali delle stesse reazioni enzimatiche, l'accumulo di questi prodotti influisce negativamente sulla idrolisi.

I fattori che influenzano la resa di una idrolisi sono la temperatura, il pH (Saddler and Gregg 1998), il tempo di residenza (Tengborg *et al.*, 2001) ed il dosaggio dell'enzima (Sun and Cheng, 2002). Poiché questo tipo di enzimi sono costosi, l'alto dosaggio enzimatico a volte necessario costituisce ancora un ostacolo alla commercializzazione dell'etanolo (Wyman, 2007). Quindi per rendere questo processo economicamente fattibile bisogna riuscire ad avere durante l'idrolisi alte concentrazioni di zuccheri con bassi carichi di enzima. Dal punto di vista economico inoltre, c'è la necessità di aumentare la resa in massa degli enzimi da parte dei funghi aumentandone la stabilità e la specificità per i specifici processi. Ulteriori sforzi nella ricerca sono stati condotti per aumentare l'efficacia dell'idrolisi enzimatica cercando di migliorare il meccanismo d'azione degli enzimi o dei loro miscugli, adottando tecniche di immobilizzazione o studi di ingegneria genetica al fine di produrre enzimi cellulasi ad un più basso costo (Cherri and Fidantset, 2003)

L'idrolisi enzimatica è seguita dalla fermentazione che può essere eseguita in diverse configurazioni sperimentali. L'idrolisi e la fermentazione possono essere condotte separatamente (in questo caso si parla di SHF *Separate Hydrolysis and Fermentation*) oppure contemporaneamente (in questo caso si parla di SSF *Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Il vantaggio di condurre la fermentazione mediante una SHF è la possibilità di condurre l'idrolisi e la fermentazione con i loro parametri sperimentali ottimali ovvero l'idrolisi con una temperatura compresa tra i 40 ed i 50°C e la fermentazione ad una temperatura intorno ai 30°C compatibile con la vita microbica. Il maggior svantaggio della SHF è invece dovuto all'accumulo degli zuccheri che inibiscono l'azione degli enzimi durante la fase di idrolisi. In una SSF invece, il glucosio prodotto è prontamente consumato dai microrganismi fermentanti che evitano l'accumulo dei prodotti finali dell'idrolisi. L'etanolo prodotto può inibire anch'esso l'idrolisi ma non in maniera così significativa come nel caso precedente. Un altro vantaggio della SSF rispetto ad una SHF è che idrolisi e fermentazione sono condotte in un unico reattore riducendo i rischi di infezione (Grohmann 1993). La temperatura a cui è condotta una SSF è

una temperatura di compromesso fra idrolisi e fermentazione di circa 35°C ma con lo sviluppo di microrganismi termostabili ci si aspetta un miglioramento dei risultati di questo tipo di fermentazione.

La resa di etanolo finale e la velocità con cui l'etanolo è prodotto non dipende solo dalla concentrazione degli zuccheri fermentabili ma anche dalla fermentabilità della soluzione. Questa è influenzata dalla concentrazione e dal tipo di sostanze rilasciate durante le fasi di pretrattamento e idrolisi presenti nei materiali di partenza o formate durante il processo.

I microrganismi più frequentemente utilizzati sono il *Saccharomyces cerevisiae* che si è rivelato molto robusto e adatto alla fermentazione degli idrolizzati provenienti dalla biomassa lignocellulosica (Olsson e Haan-Hagerdal, 1993) ed il *Zymomonas mobilis* che può fermentare il glucosio con alte rese ma è meno robusto del *Saccharomyces cerevisiae*. Poiché spesso gli idrolizzati contengono zuccheri pentosi che i precedenti microrganismi non riescono a fermentare, sono stati condotti diversi tentativi di ingegnerizzare geneticamente tali microrganismi tali renderli capaci di fermentare anche gli zuccheri pentosi (Ha *et al.*, 2010; Fox *et al* 2012).

L'ultimo passaggio alla produzione di etanolo è il suo recupero dalla soluzione di fermentazione mediante distillazione (De Bari *et al.*, 2008).

E' una tecnologia diffusissima secondo cui la miscela, attraverso una sequenza di stadi di evaporazione/condensazione, viene separata nelle frazioni componenti (etanolo e scarti acquosi), con grado di purezza variabile. Le colonne di distillazione sono progettate per operare questo processo anche su grande scala, in modo estremamente efficace, in modalità batch o in continuo. La distillazione è il metodo di separazione di fluidi di gran lunga più diffuso. Tuttavia,

può avere enormi fabbisogni energetici sia per il riscaldamento che per il raffreddamento delle correnti, ed è perciò una delle voci di costo più importanti dell'intero processo. E' stato calcolato che l'energia richiesta per la distillazione eccede quella contenuta nell'etanolo quando la sua concentrazione nel brodo è inferiore al 4% in peso.

Esistono altre tecnologie che consentono di contenere maggiormente i consumi, come quella dei setacci molecolari o della distillazione con sali, ma allo stato attuale esse non hanno raggiunto ancora una decisa competitività industriale rispetto alla distillazione tradizionale (Ligero *et al.*, 2003; Pinto *et al* 2000.,).

2.2 OBIETTIVI

Come descritto precedentemente, il processo di produzione dell'etanolo da biomassa lignocellulosica è la risultante di diverse fasi che vanno dal pretrattamento fino all'ottenimento di etanolo ed ognuno dei quali contribuisce in maniera diversa al bilancio energetico, ambientale ed economico del processo globale.

Dopo il tipo di materia prima utilizzata, il costo principale durante il processo di produzione del bioetanolo è sicuramente costituito dal pretrattamento. Inoltre la sua efficacia nel produrre un substrato prontamente idrolizzabile e fermentabile si ripercuote sull'intera economia del processo. Pertanto uno principali obiettivi di questa fase del progetto FITOPROBIO è quello di sperimentare su un' ampia selezione di biomasse, fornite dalle unità operative Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell' Università degli Studi di Padova (U.O. DAFNAE-UNIPD) e Centro Studi di Economia applicata all'Ingegneria di Catania (U.O. CSEI-CT), un pretrattamento che abbia un basso impatto sia a livello economico che energetico ed ambientale.

Il pretrattamento proposto è quindi un pretrattamento chimico in condizioni *mild* ovvero che non sia condotto in condizioni estreme dal punto di vista meccanico, termico e chimico.

Tramite questo tipo di pretrattamento chimico si mira ad ottenere un frazionamento delle componenti costituenti la fibra delle biomasse selezionate (solubilizzazione della emicellulosa con eventuale recupero di xilosio, recupero della cellulosa e solubilizzazione della lignina) ottenendo un residuo facilmente idrolizzabile dagli enzimi in commercio che sia costituito quasi esclusivamente da cellulosa. Il pretrattamento proposto prevede tre step di trattamento.

Nel primo step la biomassa tal quale è trattata con acido solforico al 2% in rapporto del 5% w/v alla temperatura di 80°C per circa 24h. Dopo questa fase il residuo ottenuto è lavato con acqua e filtrato su filtro buchner fino a neutralità e trattato con NaOH al 1% in rapporto alla temperature di 40°C per circa 24h. Al termine di questa fase la temperatura è portata a 25°C ed è aggiunta dell'acqua ossigenata al 50% fino alla concentrazione nella soluzione dell'1%. Al termine di questa fase il residuo è neutralizzato con acido acetico diluito per neutralizzare l'alcalinità residua ed in seguito lavato con acqua deionizzata.

Le basse concentrazioni di reagenti da utilizzare ed il loro basso costo nonché le basse temperature utilizzate garantiscono un basso impatto della fase del pretrattamento sia dal punto di vista energetico ed ambientale che dal punto di vista economico.

Gli effetti di ogni step della fase di pretrattamento sulla biomassa sono noti in letteratura ed ognuno di questi riguarda una specifica frazione della biomassa lignocellulosica.

In generale gli acidi diluiti solubilizzano la frazione emicellulosica della biomassa rendendola più accessibile agli attacchi enzimatici. Inoltre possono convertire l'emicellulosa solubilizzata in zuccheri fermentabili. Diversi acidi sono stati provati ma il più efficace da questo punto vista risulta essere l'acido solforico (Monsier *et al.*, 2005b).

Il pretrattamento con acidi diluiti ed in particolar modo con acido solforico è stato applicato su un'ampia varietà di biomasse lignocellulosiche (Alvira *et al.*, 2010) e può essere condotto in due maniere differenti: ad alte temperature (per esempio 180°C) per pochi minuti oppure a temperature più basse ma a tempi più lunghi (Saha *et al.*, 2005). Per questa sperimentazione è stata scelta la seconda strada che dovrebbe garantire un'alta solubilizzazione della emicellulosa ma allo stesso tempo evitare la degradazione e la solubilizzazione della frazione di cellulosa.

L'effetto che hanno invece le basi sulla biomassa lignocellulosica dipende dal contenuto di lignina della biomassa di partenza. Il pretrattamento con alcali è tanto più efficace quanto più basso è il contenuto di lignina. In genere il pretrattamento con alcali è applicabile per contenuti di lignina più bassi del 15-20%.

L'uso delle basi nei pretrattamenti aumenta la digeribilità enzimatica poiché le basi solubilizzano la lignina rompendone il suo reticolo tridimensionale ed in più hanno il vantaggio di lasciare pressoché inalterata la frazione di cellulosa (Carvalho *et al.*, 2008).

I pretrattamenti a base di alcali sono efficaci anche a basse temperature e possono essere utilizzati su un'ampia varietà di biomassa lignocellulosica come i residui agro-colturali, la paglia di mais, bagasso, paglia di grano e riso ma anche piante erbacee come lo *switchgrass* (Liang *et al.*, 2010; Park *et al.* 2010; Hendricks *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2008).

Per contro però anche se hanno condizioni sperimentali meno severe rispetto ad altri pretrattamenti hanno bisogno di tempi più lunghi per essere efficaci. I composti alcalini che possono essere utilizzati sono idrossidi di sodio, potassio e calcio ma anche l'ammoniaca. In particolare l'idrossido di sodio è stato particolarmente studiato (MacDonald D.G. *et al.*, 1983; Soto *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2008; Zhu *et al.* 2010). Esso causa il rigonfiamento delle fibre di cellulosa, diminuisce il grado di polimerizzazione della cellulosa ed il suo grado cristallino provocando la rottura della struttura della lignina (Taherzadeh and Karimi, 2008). La rimozione della lignina da parte degli alcali diminuisce il numero dei siti di assorbimento dell'enzima sulla cellulosa aumentandone l'accessibilità. Gli alcali inoltre agiscono rimuovendo i gruppi acetilici della emicellulosa riducendo gli "ostacoli" all'assorbimento degli enzimi sui siti attivi della cellulosa.

L'aggiunta di un agente ossidante come per esempio l'acqua ossigenata ad un pretrattamento alcalino può aumentare la resa della solubilizzazione della lignina. Inoltre l'uso di un

pretrattamento alcalino ossidativo non prevede la formazione di composti tossici come i furfurali che possono ostacolare la produzione di etanolo durante lo step di fermentazione (Tahezadeh and Karimi, 2008).

Sfruttando quindi l'azione sequenziale dei tre step di pretrattamento l'obiettivo è quello di ottenere circa il 90% di solubilizzazione della emicellulosa e dell'80% della lignina con un recupero di circa il 90-80% della cellulosa. In pratica si cercherà di ottenere un substrato più concentrato in cellulosa rispetto alla biomassa tal quale che dovrebbe produrre, in seguito ad idrolisi enzimatica, un idrolizzato ricco in glucosio facilmente fermentabile da *Saccharomyces cerevisiae*.

L'idrolisi enzimatica susseguente la fase di pretrattamento verrà anch'essa condotta cercando di minimizzare l'uso di enzimi, che costituiscono una voce importante nel costo totale del processo e l'apporto energetico. Come descritto in precedenza, per portare ad idrolizzare un substrato di cellulosa c'è bisogno dell'azione contemporanea di tre componenti enzimatica differenti ovvero le endoglucanasi, le exoglucanasi e le β -glucosidasi che insieme sono in grado di trasformare la cellulosa in glucosio. Per questo lavoro verranno usati 2 enzimi commerciali tra i più utilizzati allo scopo ovvero il Celluclast 1.5L ed il Novozyme 188 che insieme forniscono il giusto apporto delle componenti enzimatiche necessarie. In letteratura è riportato che il dosaggio medio per questi due enzimi è rispettivamente di 34 FPU/g di cellulosa e di 135 CBU/g di cellulosa (Bauer e Gibbons 2012). Per questo lavoro verrà sperimentato un dosaggio più basso pari a 20 FPU/g di cellulosa per il Celluclast 1.5L e di 30 CBU/g di cellulosa pari a circa il 60% del dosaggio medio di Celluclast 1.5L ed al 22% del dosaggio medio di Novozyme 188. La temperatura media a cui di solito vengono condotte le idrolisi enzimatiche è di $50\pm 5^{\circ}\text{C}$ a pH 4.0-5.0 (Saddler and Gregg, 1998).

Un altro parametro da tenere in considerazione è la concentrazione della biomassa pretrattata durante l'idrolisi. Sebbene per garantire una accettabile concentrazione finale di glucosio e quindi di etanolo il carico di biomassa dovrebbe essere pari a circa il 10% in peso, in genere carichi più bassi di biomassa pretrattata iniziale intorno al 5% si traducono in più alte rese di idrolisi e quindi di conseguenza di etanolo finale (Galbe e Zacchi, 2002).

In questo lavoro le idrolisi verranno condotte per circa 72h in maniera tale da seguirne il completo andamento. La temperatura ottimale a cui condurre una idrolisi dipende però anche dal tempo durante il quale è condotta l'idrolisi. In letteratura ci sono evidenze sperimentali per cui per tempi di idrolisi superiori alle 24h la temperatura ideale è di circa 40°C (Tengborg *et al.*, 2001). Pertanto le idrolisi saranno condotte a 40°C a pH di circa 5 e con un carico di

biomassa pretrattata pari al 5% in peso e verranno seguite per circa 72h per monitorarne il completo andamento.

Al termine della fase di idrolisi, gli idrolizzati sono inoculati con un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* isolato dall'ENEA (M861/10a) resistente ad alte concentrazioni di etanolo (fino al 17%) e particolarmente efficiente sia in termini di velocità di fermentazione che in termini di resa finale di etanolo ottenuto. L'obiettivo è quello di massimizzare le rese di idrolisi e fermentazione espresse come percentuali delle rese teoriche. Le rese verranno calcolate quantificando il glucosio prodotto durante la fase di idrolisi e l'etanolo prodotto durante la fase di fermentazione mediante HPLC.

La sperimentazione, dal pretrattamento alla fermentazione, sarà condotta nella maniera seguente: le biomasse fornite dalle altre U.O. saranno dapprima caratterizzate dal punto di vista composizionale andandone a determinare il contenuto degli elementi di carbonio, azoto, idrogeno, ossigeno e zolfo mediante analisi elementare ed il contenuto di potassio, calcio e magnesio mediante ICP-OES (Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spettroscopy). Ma soprattutto verranno determinati i contenuti dei principali costituenti della fibra lignocellulosica ovvero emicellulosa, cellulosa e lignina. Di conseguenza una prima scelta sul tipo di biomasse da utilizzare nella sperimentazione avverrà in base ai contenuti iniziali di fibra. In una prima fase di screening le prove di pretrattamento, idrolisi e fermentazione verranno condotte in fase beuta sulle biomasse selezionate al fine di sondarne su piccola scala le potenzialità di produzione di glucosio ed etanolo. Al termine di questa fase, per le biomasse che avranno dato i migliori risultati sia in termini di produttività della biomassa sia in termini di rese di produzione di glucosio ed etanolo, le esperienze saranno replicate in fermentatori su scala banco da 2 o 5 litri. Le condizioni di reazioni più controllate in fermentatore (migliore agitazione e mescolamento del campione, controllo automatico del pH, della temperatura e dell'ossigeno disciolto) dovrebbero garantire maggiori rese di produzione di glucosio ed etanolo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 LE BIOMASSE SELEZIONATE

Le biomasse oggetto di questa parte di sperimentazione sono state inviate all'unità U.O. BAS-ENEA dalle unità operative DAFNAE-UNIPD e CSEI-CT. Esse provengono da diversi siti sperimentali di fitodepurazione sia su scala pilota che reale e sono riassunte nella tabella 2.

DAFNAE-UNIPD	CSEI-CT
<i>Acorus calamus</i>	<i>Arundo Donax</i>
<i>Arundo donax</i>	<i>Canna indica</i>
<i>Canna indica</i>	<i>Cyperus papyrus</i>
<i>Carex elata</i>	<i>Miscanthus x giganteus</i>
<i>Carex pseudocyperus</i>	<i>Phragmites australis</i>
<i>Carex riparia</i>	<i>Sorghum bicolor</i>
<i>Cladium mariscus</i>	<i>Vetiveria zizanioides.</i>
<i>Cyperus longus</i>	
<i>Glyceria maxima</i>	
<i>Helianthus tuberosus</i>	
<i>Iris Pseudocorus</i>	
<i>Juncus effusus</i>	
<i>Lytrum salicaria</i>	
<i>Mischantus x giganteus</i>	
<i>Phalaris arundinacea</i>	
<i>Phragmites australis</i>	
<i>Scirpus sylvaticus</i>	
<i>Symphitum officinalis</i>	
<i>Thalia dealbata</i>	
<i>Typha latifolia</i>	

Tabella 2. Biomasse inviate dalle U.O. DAFNAE-UNIPD e CSEI-CT.

Le biomasse selezionate provengono da un unico taglio ottenuto a maturazione della pianta in maniera tale da eliminare ogni difformità nei risultati dovuta alla diversa età della pianta.

A tal scopo sono state prese anche in considerazione le seguenti specie vegetali ottenute da tagli frequenti: *Arundo donax*, *Carex riparia*, *Mischantus x giganteus*, *Symphitum officinalis* fornite dalla U.O. DAFNAE-UNIPD.

3.2 CARATTERIZZAZIONE DELLE BIOMASSE

3.2.1 Analisi elementare

L'analisi elementare è una tecnica di analisi che permette la determinazione del contenuto totale degli elementi di C, N, H, S ed O nelle biomasse. L'analisi prevede 4 fasi di esecuzione: omogeneizzazione, deumidificazione, pesata ed analisi del campione. A tal scopo sono stati utilizzati i seguenti strumenti: mulino a coltelli A10 – IKA, stufa da vuoto NSV9035 – ISCO, bilancia analitica AT21 Comparator - METTLER TOLEDO e l'analizzatore elementare EA 1110 CHNS-O - CE INSTRUMENTS (figura 3).



Figura 3. Analizzatore elementare EA 1110 CHNS-O - CE INSTRUMENTS.

Nelle analisi elementari viene sfruttata la reazione di combustione completa del campione grazie alle condizioni operative di temperatura elevata e ambiente ricco di ossigeno presenti durante la fase di combustione del campione da analizzare.

Il campione deve essere omogeneo, a causa delle quantità molto ridotte con cui si lavora, e secco per impedire che l'idrogeno presente nell'acqua si sommi a quello effettivamente presente nel campione.

Analogamente, per impedire l'inquinamento del campione da parte degli elementi da analizzare eventualmente presenti nel gas carrier, è fondamentale lavorare con gas elio con una purezza non inferiore al 99,999%

Dopo essere stato quindi omogeneizzato e deumidificato, il campione viene pesato in una capsula di stagno e immesso nel reattore costituito da un tubo di quarzo alloggiato in un forno riscaldato ad una temperatura di 1000°C.

Il tubo di quarzo è continuamente attraversato da un flusso di elio che al momento dell'iniezione del campione viene arricchito di ossigeno.

I gas prodotti dalla decomposizione del campione nel tubo di quarzo attraversano prima lo strato ossidante di anidride tungstica (WO_3) e successivamente lo strato riducente di rame metallico (Cu).

La miscela di gas in uscita dal tubo di quarzo, costituita da azoto (N_2), anidride carbonica (CO_2), acqua (H_2O) ed anidride solforosa (SO_2), viene convogliata verso il sistema di rilevazione costituito da un gascromatografo provvisto di un forno con una colonna cromatografica e da un rivelatore a termoconducibilità.

Il passaggio attraverso la colonna ed il rivelatore produce un cromatogramma i cui picchi vengono integrati ed in base alle pesate effettuate il software calcola le percentuali di C, H, N e S presenti nel campione. L'ossigeno è calcolato come il complemento a cento delle percentuali calcolate.

Al fine di eseguire tali analisi, per ogni campione sono stati macinati circa 5 g di materiale fino ad ottenere una polvere sottile.

Una volta omogeneizzato, il campione è stato seccato nella stufa da vuoto per 105°C per un minimo di 8h e comunque fino al raggiungimento del peso costante.

Dal campione omogeneizzato e deumidificato sono stati prelevati e pesati mediante la bilancia AT21 Comparator della METTLER TOLEDO circa 3 mg di materiale.

Ad ogni campione sono stati addizionati circa 0,6 g di pentossido di vanadio (V_2O_5) usato come catalizzatore dell'ossidazione dell' SO_2 ad SO_3 .

Prima di eseguire le analisi, lo strumento viene tarato con delle sostanze a contenuto noto in termini percentuali di C, H, N, S e O. Gli standard subiscono le stesse fasi di preparazione dei campioni ovvero omogeneizzazione, deumidificazione, aggiunta di V_2O_5 .

Alla fine di queste fasi preliminari i campioni e gli standard vengono introdotti nello strumento mediante un iniettore e quantificati replicando le analisi per un minimo di 3 volte.

3.2.2 Analisi di K, Mg, Ca mediante ICP-OES (*Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*)

I campioni di biomassa devono essere dapprima mineralizzati per poter essere analizzati mediante la tecnica dell'ICP-OES.

I campioni precedentemente essiccati a 105°C *overnight* sono stati pesati ed introdotti nei contenitori in teflon del mineralizzatore. In ciascun vessel è stato aggiunto acido nitrico ultrapuro (10ml). Il programma di mineralizzazione prevede tre step in gradiente di temperatura così come suggerito dalle metodiche proposte dalla casa costruttrice step : step 1 rampa 15min fino a 190°C – step 2 25min a 190°C – step 3 raffreddamento. Dopo la mineralizzazione i contenitori sono stati aperti con estrema precauzione sotto cappa per eliminare gli ossidi di azoto ed il contenuto trasferito quantitativamente in matracci di vetro di classe A da 50ml.

Le soluzioni ottenute sono state analizzate mediante lo strumento Perkin Elmer Optima 2000 DV in configurazione assiale (figura 4), ottica costituita da doppio monocromatore Echelle con due rivelatori CCD (bidimensionale) retroilluminati e raffreddati. La tecnica ICP-OES in teoria è soggetta sia ad interferenze spettrali sia ad interferenze non spettrali o fisiche (associate al trasporto fisico del campione nello strumento, cioè le differenze di viscosità e tensione superficiale tra il campione e gli standard acquosi di calibrazione). Le interferenze fisiche possono essere compensate mediante l'uso di un elemento di riferimento, cioè di uno standard interno (non presente nella matrice). Una interferenza spettrale invece è dovuta alla presenza di luce alla lunghezza d'onda dell'analita che non è dovuta all'analita o al semplice rumore di fondo. Essa può avere diverse cause, ad esempio la deriva del fondo e l'interferenza diretta di un'altra specie elementare o ionica. Per ovviare a queste interferenze vi sono diverse tecniche e algoritmi di correzione (es. equazioni matematiche di correzione note come correzioni interelementari IEC). Esse si basano sulla misura dell'entità della sovrapposizione di banda di una specie interferente su un analita. Nel corso delle analisi non è stato necessario ricorrere ad alcun algoritmo matematico di correzione spettrale per

mancanza di sovrapposizioni o altre forme di interferenza. Le analisi quantitative sono state condotte mediante l'utilizzo di standard esterni certificati per ICP-OES opportunamente diluiti alle concentrazioni richieste, e la calibrazione effettuata costruendo la retta su 4 punti, nel caso specifico nell'intervallo 0-10 mg/L, diluendo di 10 volte il campione mineralizzato. Le mineralizzazioni sono state replicate 2 volte e ciascun campione ottenuto è stato analizzato per un minimo di 3 volte mediante ICP-OES.

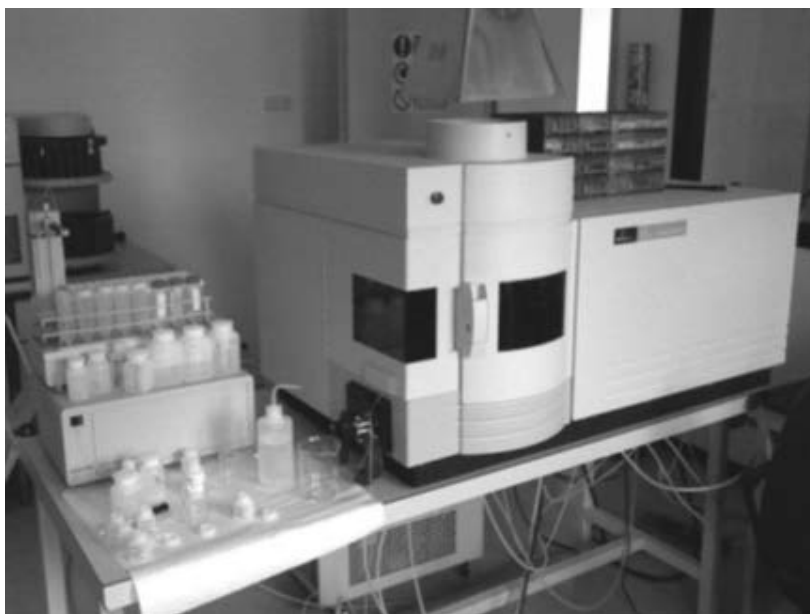


Figura 4. Spettrofotometro– ICP OES Perkin Elmer Optima 2000DV.

3.2.3 Determinazione del contenuto di fibre

Le analisi del contenuto delle fibre sono state eseguite utilizzando un estrattore di fibra grezza fornito dalla ditta VELP SCIENTIFICA modello FIWE 6 (figura 5).



Figura 5. Analizzatore di fibre VELP FIWE6 Raw Fiber Extractor.

Questa apparecchiatura è stata studiata appositamente per i metodi di estrazione della fibra in modo tale da facilitare enormemente la standardizzazione delle condizioni di analisi.

Lo strumento è costituito essenzialmente da 6 postazioni in cui vengono alloggiati altrettanti crogiuoli che hanno la base munita di pori del diametro di 45 μm per consentire la filtrazione e la raccolta del campione, una resistenza elettrica di quarzo per il riscaldamento del campione, una pompa peristaltica per aspirare il surnatante ed una pompa pneumatica per il mescolamento del campione e dei solventi tramite aria.

Sono state inoltre utilizzate una muffola THERMOLYNE mod. 62700 per la determinazione delle ceneri e una bilancia analitica alla quarta cifra decimale per le pesate mod. KERN 870.

I vegetali sono composti da sostanze appartenenti a diverse categorie come idrati di carbonio, grassi, proteine, sali minerali e polimeri complessi come la lignina. I diversi

componenti delle fibre vengono quantificati estraendoli successivamente con reagenti neutri, alcalini o acidi ciascuno dei quali è in grado di portare in soluzione un componente lasciando indisturbato gli altri. Diverse sono le tecniche di analisi che possono dare questo tipo di informazione. Per questo lavoro è stata scelta la metodica di Van Soest che permette, mediante un sistema sequenziale di analisi, la determinazione dei principali componenti della fibra ovvero sostanze solubili (denominate nel loro insieme come fibra solubile e/o estrattivi) emicellulosa, cellulosa, lignina e ceneri (Van Soest e Robertson, 1979).

Nello schema di analisi di Van Soest, la biomassa viene dapprima macinata, seccata e setacciata in maniera tale da passare attraverso un setaccio con pori di 1mm (18 mesh).

Un grammo della biomassa così preparata è pesato in un crogiuolo di vetro che ha la base fornita di pori del diametro di 45µm. Il crogiuolo con la biomassa è quindi messo nell'estrattore VELP FIWE6 che può alloggiare fino ad un massimo di 6 crogiuoli per analisi. A questo punto vengono aggiunti a freddo 100 ml di soluzione detergente neutra così composta (tabella. 3):

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

Tabella 3. Soluzione al detergente neutro.

La soluzione è riscaldata fino all'ebollizione e quindi mantenuta per 60 minuti. Al termine del riscaldamento la soluzione viene filtrata e lavata per 3 volte con acqua distillata bollente e successivamente 2 volte con acetone freddo. Con questo metodo vengono solubilizzati i carboidrati solubili, la maggior parte delle proteine, i lipidi e le sostanze minerali solubili. Il contenuto solubile compone i cosiddetti estrattivi o fibra solubile (NDS). Il residuo invece rappresenta i costituenti fibrosi delle cellule vegetali: emicellulosa, cellulosa, lignina e ceneri (NDF). Il residuo è quindi seccato in stufa a 105°C per un minimo di 8h e comunque fino a peso costante.

Il residuo NDF è quindi ulteriormente trattato con 100ml di soluzione al detergente acido così composta (tabella 4):

Specie	Conc.
C₁₉H₄₂O₇BrN	0,08 M
H₂SO₄	1 N

Tabella 4. Soluzione al detergente acido.

La soluzione è riscaldata fino all'ebollizione e quindi mantenuta per 60 minuti. Al termine del riscaldamento la soluzione viene filtrata e lavata per 3 volte con acqua distillata bollente e successivamente 2 volte con acetone freddo. Con questo metodo viene solubilizzata selettivamente l'emicellulosa così che il residuo risulta essere costituito solamente da cellulosa, lignina e ceneri (ADF). Il residuo è quindi seccato in stufa a 105°C per un minimo di 8h e comunque fino a peso costante. La differenza tra NDF ed ADF rappresenta il contenuto percentuale di emicellulosa.

Il residuo ADF è infine trattato con 25ml di H₂SO₄ al 72% a freddo e per 3h, avendo cura di agitare il campione ogni ora. Al termine dell'estrazione il campione è filtrato e lavato con acqua bollente fino a neutralità, seccato a 105°C per 8h e comunque fino a peso costante.

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

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

A questo punto i crogiuoli in cui ormai è rimasto solo il residuo ADL, sono introdotti in una muffola dove il residuo ADL è incenerito a 550°C per 2h. Una volta raffreddati in essiccatore, i campioni sono quindi pesati per la determinazione delle ceneri.

3.3 PRETRATTAMENTO, IDROLISI E FERMENTAZIONE: PROVE PRELIMINARI IN BEUTA

3.3.1 Pretrattamento della biomassa

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

I campioni macinati (18 mash) e seccati sono trattati con H₂SO₄ al 2% alla temperatura di 80°C per circa 24h usando una concentrazione di biomassa pari al 5% w/v (circa 45g di biomassa secca in 900ml di H₂SO₄ al 2% in una bottiglia da 1 L). Le bottiglie sono poste in un bagno termostatico su un piano basculante mantenuto alla velocità di agitazione di 130 rpm. Questo passaggio ha lo scopo di allontanare l'emicellulosa (Curreli *et al.*, 2002). Dopo 24h il residuo è filtrato, lavato abbondantemente con acqua distillata fino a perdita della acidità e seccato overnight alla T di 105°C fino a peso costante. Il residuo secco è trattato per 24h con NaOH all' 1% alla T di 40°C usando sempre una concentrazione di biomassa pari al 5% v/W e mantenendo il tutto sotto agitazione di 130 rpm. Al termine delle 24h è aggiunto dell' H₂O₂ al 50% fino alla concentrazione dell'1% e la T portata a 25°C. In questa ultima fase il pretrattamento viene eseguito mantenendo al buio le bottiglie coprendole con dei fogli di alluminio in modo tale da evitare la foto-decomposizione dell'acqua ossigenata. Questo passaggio ha lo scopo di allontanare la lignina e l'eventuale residuo di emicellulosa del passaggio precedente (Curreli *et al.*, 1997). Il residuo così ottenuto è filtrato, lavato dapprima con acido acetico 0.1M per abbattere l'alcalinità residua ed in seguito con acqua deionizzata, seccato overnight alla T di 105°C fino a peso costante. Una piccola parte del campione è usata per l'analisi del contenuto in fibre alla fine del pretrattamento. La restante parte è avviata all'idrolisi e fermentazione per la produzione di etanolo. Al termine del pretrattamento è stata nuovamente determinata la composizione in fibre mediante il metodo di Van Soest (come descritto nella sezione precedente).

3.3.2 Idrolisi della biomassa

L'idrolisi della biomassa pretrattata è stata condotta utilizzando un mix di due enzimi commerciali acquistati da Sigma–Aldrich: Celluclast 1.5L (Cellulase) prodotto da *Trichoderma reesei* (Cat C2730, Lot 058K1200) e Novozyme 188 (Cellobiase) prodotto da *Aspergillus niger* (Cat C6105, Lot 058K1144). E' stata misurata l'attività dei due enzimi come descritto nel metodo di Ghose (Ghose 1987). Per il Celluclast 1.5L l'attività è stata misurata in 70 FPU (filter paper units)/ml e di 230 CBU (b-glucosidase units)/ml per il Novozyme 188. Cinque grammi di ogni campione pretrattato sono stati risospesi in una beuta del volume di 500 ml contenente 100 ml di substrato liquido costituito da 4,5 g/l di KH_2PO_4 anidro (tampone a pH 5); 2 g/l di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g/l di NaCl; 1 g/l di estratto di lievito; 100 $\mu\text{l/l}$ di CaCl_2 [1 M]; 1 ml/l di MgSO_4 [1 M]; pH 5 ± 0.2 . Le beute sono state sterilizzate in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Successivamente al substrato liquido, in condizioni di sterilità, sono stati addizionati i due enzimi alla dose di 20 FPU/g di cellulosa (Celluclast 1.5 L) e di 30 CBU/g di cellulosa (Novozyme 188). Le beute sono state incubate a 40 °C per 72 ore a 110 RPM. Per non compromettere la sterilità delle beute durante l'idrolisi è stato prelevato un solo campione al termine delle 72h e conservato a -20 °C fino ad analisi mediante HPLC.

3.3.3 Fermentazione degli idrolizzati

Al termine delle 72 ore di idrolisi, ad ogni beuta sono stati aggiunti 0,3 ml di NaOH 6 M per costituire un tampone fosfato a pH 6. Ciascuna beuta è stata quindi direttamente inoculata con il ceppo M861/10a di *S. cerevisiae* isolato da ENEA con una quantità di biomassa microbica di 1g/l pari a $3,6 \cdot 10^8$ CFU/ml. A tal scopo è stata utilizzata la biomassa microbica (rapporto 1:4) ottenuta dalla centrifugazione di 25 ml di una coltura di 24 ore di *S. cerevisiae* in YPD broth. La fermentazione è stata condotta in anaerobiosi a 30°C per 24 ore a 110 RPM. Poiché l'idrolisi e fermentazione sono state condotte a T diverse il processo può essere considerato come una SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*). Al termine della fermentazione sono stati prelevati campioni di brodo culturale per l'analisi mediante HPLC del glucosio residuo e dell'etanolo prodotto.

3.3.4 Analisi HPLC degli idrolizzati e fermentati

Le analisi degli idrolizzati e dei prodotti di fermentazione sono state eseguite utilizzando un HPLC VARIAN della serie ProStar dotato di detector ad indice di rifrazione. Il metodo di analisi utilizzato permette la contemporanea determinazione di xilosio, glucosio ed etanolo. Il metodo HPLC usato è il seguente: colonna METACARB H PLUS, eluente acido solforico 8 mM (in acqua deionizzata), flusso 0,4 ml/min, temperatura della colonna 65°C, durata della corsa: 30 min (Martin *et al.*, 2007).

3.4 PRETRATTAMENTO, IDROLISI E FERMENTAZIONE. PROVE IN FERMENTATORE

3.4.1 Pretrattamento della biomassa

Il pretrattamento delle biomasse per le prove da eseguire in fermentatore è stato condotto in maniera del tutto analoga a quanto spiegato nella sezione 2.2.1. Per poter ottenere la quantità di biomassa necessaria alle prove di idrolisi e fermentazione nei bioreattori da 2 e/o 5 litri, il pretrattamento delle biomasse è stato condotto utilizzando un bottiglione da 10 litri.

3.4.2 Idrolisi e fermentazione della biomassa mediante SHF

(SEPARATE HYDROLYSIS AND FERMENTATION)

L'idrolisi della biomassa pretrattata è stata condotta in maniera analoga a quanto descritto nella sezione 2.2.2. Una quantità compresa tra i 50-150 grammi di biomassa pretrattata, in dipendenza della quantità di biomassa recuperata dal precedente step di pretrattamento, è posta in fermentatori del volume di lavoro di 1,5-5 litri modello BBI BIostat B. E' stata quindi aggiunta una quantità di soluzione tampone con i necessari nutrienti e microelementi, tale da mantenere il rapporto del 5% w/v. La soluzione è così composta: a 4,5 g/l di KH₂PO₄ anidro (tampone a pH 5); 2 g/l di (NH₄)₂SO₄; 0,5 g/l di NaCl; 1 g/l di estratto di lievito; 100 µl/l di CaCl₂ [1 M]; 1 ml/l di MgSO₄ [1 M]; pH 5 ± 0.2. I fermentatori sono stati

sterilizzati in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Successivamente, dopo aver raffreddato il fermentatore fino alla temperatura di idrolisi, sono stati addizionati i due enzimi alla dose di 20 FPU/g di cellulosa (Celluclast 1.5 L) e di 30 CBU/g di cellulosa (Novozyme 188) in condizioni di sterilità sfruttando il sistema di introduzione automatico di substrati di cui sono dotati i fermentatori. L'idrolisi è stata quindi condotta per 72 ore a 40 °C selezionando una opportuna velocità di agitazione durante l'idrolisi tale da garantire l'ottimale rimescolamento della soluzione durante tutta l'idrolisi. All' inizio infatti la viscosità del miscuglio è elevata e pertanto c'è bisogno di velocità di agitazione più elevate. Man mano che l'idrolisi va avanti, il substrato è liquefatto dagli enzimi, la viscosità diminuisce e sono necessarie velocità di agitazione più basse. L'andamento dell'idrolisi è stato seguito prelevando un campione dal fermentatore ogni 24 ore sfruttando il sistema di prelievo di cui è fornito il fermentatore e che permette di prelevare il campione in completa sterilità. I campioni prelevati sono quindi posti in un bagno di acqua bollente per 5 minuti allo scopo di deattivare gli enzimi e bloccare l'idrolisi, lasciati raffreddare e conservati in congelatore alla temperatura di -20°C.

Al termine delle 72 ore di idrolisi, prima di inoculare e di iniziare la fermentazione, il pH è portato al valore di 6 e mantenuto costante a questo valore durante le 24 ore di fermentazione. Il controllo del pH avviene in maniera automatica usando un sistema di pompe dosatrici che immettono nel fermentatore opportunamente due soluzioni di NaOH all' 1% e acido solforico al 2%. Il fermentatore è stato quindi inoculato con il ceppo M861/10a di *S. cerevisiae* isolato da ENEA con una quantità di biomassa microbica di 1g/l pari a $3,6 \cdot 10^8$ CFU/ml. A tal scopo è stata utilizzata la biomassa microbica (rapporto 1:4) ottenuta dalla centrifugazione di 25 ml di una coltura di 24 ore di *S. cerevisiae* in YPD broth. La fermentazione è stata condotta in anaerobiosi a 30 °C per 24 ore a 110 RPM. Poiché l'idrolisi e fermentazione sono state condotte a temperature diverse il processo può essere considerato come una SHF sebbene non c'è stata la separazione tra residuo solido e fermentato. Al termine della fermentazione sono stati prelevati campioni di brodo colturale ed analizzato mediante HPLC.

3.4.3 Idrolisi e fermentazione della biomassa mediante SSF

(SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION)

In un'altra serie di esperimenti, una quantità di circa 50-150 grammi di biomassa pretrattata, in dipendenza della quantità di biomassa recuperata dal precedente step di pretrattamento, è

posta in fermentatori del volume di lavoro di 1,5-5 litri modello BBI BIOSTAT B. E' stata quindi aggiunta una quantità di soluzione tampone con i necessari nutrienti e microelementi, tale da mantenere il rapporto del 5% W/v. La soluzione è così composta: a 4,5 g/l di KH_2PO_4 anidro (tampone a pH 5); 2 g/l di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g/l di NaCl; 1 g/l di estratto di lievito; 100 $\mu\text{l/l}$ di CaCl [1 M]; 1 ml/l di MgSO_4 [1 M]; pH 5 ± 0.2 . I fermentatori sono stati sterilizzati in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Successivamente, dopo aver raffreddato il fermentatore alla temperatura di idrolisi, sono stati addizionati i due enzimi alla dose di 20 FPU/g di cellulosa (Celluclast 1.5 L) e di 30 CBU/g di cellulosa (Novozyme 188) in condizioni di sterilità sfruttando il sistema di introduzione automatico di substrati di cui sono dotati i fermentatori ed il pH aggiustato al valore di 5.5. A questo punto il sistema è stato inoculato con il ceppo M861/10a di *S. cerevisiae* isolato da ENEA in maniera analoga a quanto fatto nel caso precedente. In questo caso poiché l'idrolisi e la fermentazione sono condotte contemporaneamente si è scelto la temperatura di 35°C (Isci *et al.*, 2008). La fermentazione è stata seguita per 96 ore prelevando un campione ad intervalli regolari di 24 ore. I campioni prelevati sono stati quindi immersi in acqua bollente per 5 minuti per deattivare l'enzima e conservati a -20°C. Su ogni campione è stato quindi determinato il contenuto di glucosio ed etanolo mediante HPLC.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE BIOMASSE

Qui di seguito riportiamo i risultati della caratterizzazione delle specie vegetali ricevute dalle U.O. DAFNAE-UNIPD e CSEI-CT consistente nella determinazione del contenuto totale di C, N, H, O e S (analisi elementare), il contenuto di Mg, Ca e K e soprattutto la composizione delle fibre in termini di contenuto percentuale di emicellulosa, cellulosa e lignina.

SPECIE VEGETALE	% N	% C	% H	% O	% S
<i>Acorus calamus</i>	2,02±0,07	42,75±0,32	4,87±0,15	50,52±0,18	assente
<i>Arundo donax</i>	1,04±0,09	42,16±1,78	5,26±0,39	51,54±1,88	assente
<i>Canna indica</i>	1,32±0,09	40,58±0,27	5,01±0,19	52,49±0,48	assente
<i>Carex elata</i>	1,042±0,001	44,46±0,43	4,43±0,17	49,20±0,99	assente
<i>Carex pseudocyperus</i>	1,56±0,43	50,57±0,36	7,59±0,33	40,29±0,40	assente
<i>Carex riparia</i>	3,18±0,44	46,88±5,23	5,70±0,42	44,24±6,09	assente
<i>Cladium mariscus</i>	0,99±0,04	43,12±3,14	5,01±0,63	50,88±3,73	assente
<i>Cyperus longus</i>	0,34±0,04	43,96±0,03	4,41±0,38	51,25±0,50	assente
<i>Glyceria maxima</i>	0,93±0,03	45,74±0,15	4,66±0,06	49,52±0,30	assente
<i>Helianthus</i>	0,40±0,03	44,35±2,15	5,60±0,43	49,65±1,75	assente
<i>Iris Pseudocorus</i>	1,28±0,10	43,38±0,16	5,17±0,27	50,11±0,21	assente
<i>Juncus effusus</i>	1,36±0,01	43,24±0,10	5,00±0,02	50,39±0,07	assente
<i>Lytrum salicaria</i>	0,35±0,01	46,20±0,08	4,86±0,24	48,85±0,40	assente
<i>Mischantus x giganteus</i>	0,73±0,06	44,51±0,26	5,53±0,39	49,69±0,21	assente
<i>Phalaris arundin.</i>	1,52±0,01	42,16±0,32	5,13±0,44	47,20±0,77	assente
<i>Phragmites australis</i>	1,34±0,02	44,34±0,27	4,45±0,11	48,89±0,26	assente
<i>Scirpus</i>	0,31±0,01	43,83±0,46	4,47±0,02	51,39±0,08	assente
<i>Symphitum officinalis</i>	1,34±0,02	44,14±0,29	4,87±0,34	50,63±0,10	assente
<i>Thalia dealbata</i>	0,72±0,02	41,12±0,29	4,80±0,07	52,19±0,47	assente
<i>Typha latifolia</i>	1,45±0,04	45,60±1,42	5,75±0,22	47,20±1,96	assente

Tabella 5. Contenuto percentuale degli elementi C, H, N,S, ed O per le biomasse inviate dalla U.O. DAFNAE-UNIPD. L'ossigeno è stato ricavato per differenza.

SPECIE VEGETALE	% N	% C	% H	% O	%S
<i>Arundo Donax</i>	0,26±0,02	45,32±0,90	5,25±0,36	48,06±1,01	assente
<i>Canna indica</i>	1,24±0,63	41,73±3,42	4,09±0,83	52,93±4,21	assente
<i>Cyperus papyrus</i>	0,43±0,01	40,86±0,23	5,25±0,05	52,35±0,16	assente
<i>Miscanthus x giganteus</i>	0,15±0,01	44,36±0,40	5,09±0,32	49,24±0,56	assente
<i>Phragmites australis</i>	1,16±0,01	43,97±0,41	5,12±0,22	49,74±0,50	assente
<i>Sorghum bicolor</i>	0,70±0,01	42,38±0,84	5,24±0,36	49,54±0,90	assente
<i>Vetiveria zizanoides.</i>	0,43±0,01	43,83±0,46	5,05±0,36	49,93±0,07	assente

Tabella 6. Contenuto percentuale degli elementi C, H, N,S. ed O per le biomasse inviate dalla U.O. CSEI- CT. L'ossigeno è stato ricavato per differenza.

In tabella 5 ed in tabella 6 sono riportati i valori delle composizioni percentuali degli elementi C, H, N,S ed O rispettivamente per le biomasse inviate dalle U.O DAFNAE-UNIPD e CSEI-CT espresse come percentuale della biomassa secca. Per tutti i campioni lo zolfo è risultato assente o comunque sotto il limite di rilevabilità. L'ossigeno è stato determinato come differenza a cento della somma delle percentuali di N, C, ed H.

Gli elementi maggiormente presenti sono C ed O ed in maniera minore l'H poiché le biomasse sono costituite essenzialmente da emicellulosa, cellulosa e lignina che sono polimeri a base di C, H ed O. Il minore contenuto di azoto è dovuto ai più contenuti proteici e peptidici nelle biomasse.

In tabella 7 ed 8 ed in figure 6 e 7 invece sono riportati i valori delle composizioni percentuali degli elementi Mg, Ca e K rispettivamente per le biomasse inviate dalle U.O DAFNAE-UNIPD e CSEI-CT espresse come percentuale della biomassa secca.

Tra gli elementi alcalini ed alcalino-terrosi il potassio è quello maggiormente presente mentre il Magnesio è quello con il contenuto più basso.

Le analisi delle fibre sulle biomasse fornite dalle u U.O. DAFNAE-UNIPD e CSEI-CT condotte con il metodo gravimetrico di Van Soest hanno i seguenti risultati riportati rispettivamente nelle tabelle 9 e 10. I dati sono espressi come percentuale delle singole componenti della fibra rispetto alla massa secca.

SPECIE VEGETALE	%Ca	% K	%Mg
<i>Acorus calamus</i>	1,137±0,005	3,914±0,015	0,291±0,001
<i>Arundo donax</i>	0,115±0,020	0,823±0,093	0,048±0,008
<i>Canna indica</i>	0,275±0,070	3,244±0,186	0,845±0,020
<i>Carex elata</i>	0,797±0,005	0,561±0,008	0,488±0,005
<i>Carex pseudocyperus</i>	2,701±0,109	1,154±0,010	1,119±0,059
<i>Carex riparia</i>	0,633±0,016	2,593±0,042	0,211±0,001
<i>Cladium mariscus</i>	0,595±0,001	2,136±0,204	0,204±0,012
<i>Cyperus longus</i>	1,338±0,006	2,556±0,033	0,116±0,001
<i>Glyceria maxima</i>	0,580±0,032	1,772±0,151	0,315±0,023
<i>Helianthus tuberosus</i>	0,557±0,004	1,865±0,079	0,298±0,033
<i>Iris pseudocorus</i>	2,407±0,049	3,684±0,024	0,344±0,002
<i>Juncus effusus</i>	1,248±0,004	0,630±0,037	0,548±0,010
<i>Lytrum salicaria</i>	0,432±0,021	0,372±0,012	0,0153±0,003
<i>Mischantus x giganteus</i>	0,280±0,028	0,271±0,011	0,050±0,007
<i>Phalaris arundinacea</i>	0,554±0,030	1,793±0,101	0,316±0,014
<i>Phragmites australis</i>	0,163±0,009	0,508±0,006	0,065±0,008
<i>Scirpus sylvaticus</i>	0,716±0,004	2,880±0,081	0,151±0,001
<i>Symphitum officinalis</i>	2,269±0,018	8,436±0,062	0,446±0,021
<i>Thalia dealbata</i>	0,699±0,012	0,880±0,063	0,183±0,006
<i>Typha latifolia</i>	1,144±0,003	0,528±0,009	0,500±0,002

Tabella 7. Contenuto percentuale degli elementi Mg, Ca e K per le biomasse inviate dalla U.O. DAFNAE-UNIPD.

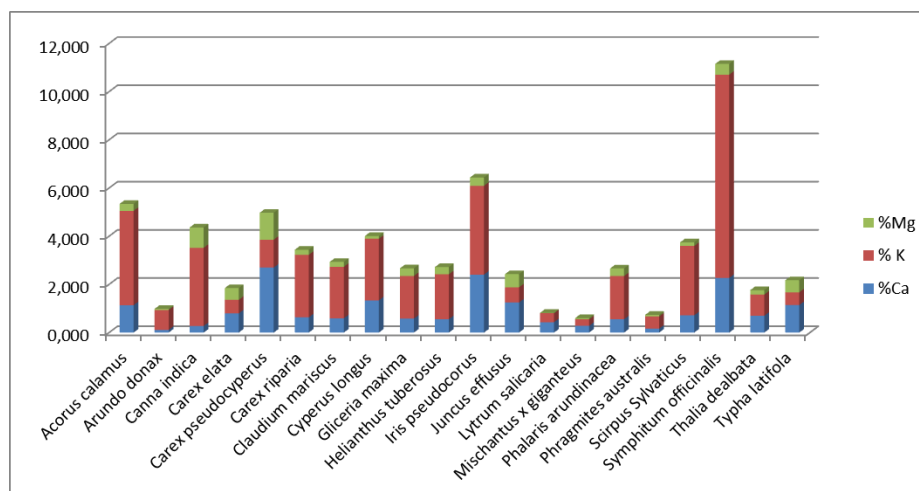


Figura 6. Contenuto percentuale degli elementi Mg, Ca e K per le biomasse inviate dalla U.O. DAFNAE-UNIPD.

SPECIE VEGETALE	%Ca	% K	%Mg
<i>Arundo Donax</i>	0,110±0,032	1,007±0,124	0,053±0,004
<i>Canna indica</i>	0,320±0,008	3,406±0,081	0,871±0,030
<i>Cyperus papyrus</i>	0,254±0,029	1,195±0,191	0,232±0,006
<i>Miscanthus x giganteus</i>	0,387±0,008	0,375±0,002	0,045±0,001
<i>Phragmites australis</i>	0,260±0,007	0,626±0,046	0,062±0,002
<i>Sorghum bicolor</i>	0,414±0,002	0,834±0,015	0,147±0,005
<i>Vetiveria zizanioides</i>	0,356±0,004	1,535±0,071	0,123±0,001

Tabella 8. Contenuto percentuale degli elementi Mg, Ca e K per le biomasse inviate dalla U.O. CSEI-CT.

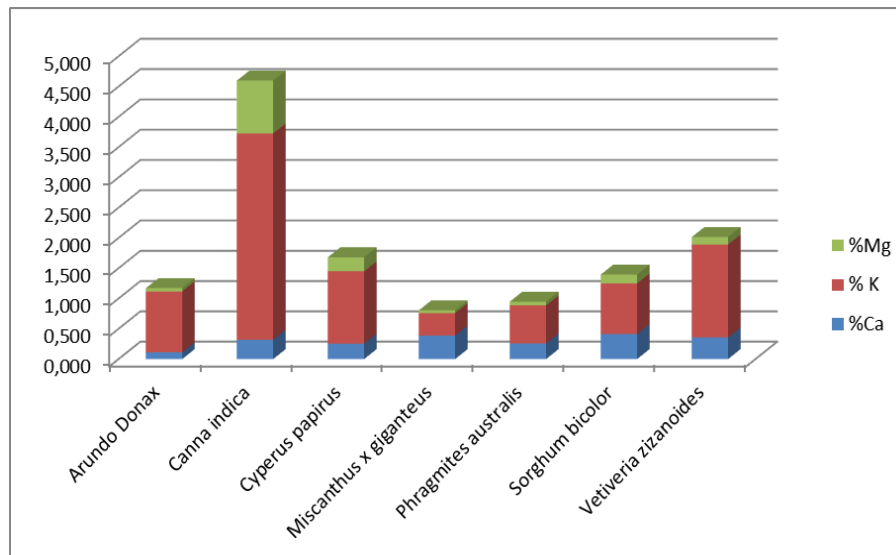


Figura 7. Contenuto percentuale degli elementi Mg, Ca e K per le biomasse inviate dalla U.O. CSEI-CT.

SPECIE VEGETALE	% Estrattivi	% Emicellulosa	% Cellulosa	% Lignina	% Ceneri
<i>Acorus calamus</i>	42,33±0,74	26,78±0,69	23,98±0,52	6,77±0,5	0,13±0,07
<i>Arundo donax</i>	22,35±1,95	31,87±0,23	38,45±1,20	7,34±1,17	0,27±0,17
<i>Canna Indica</i>	31,75±0,39	31,05±0,93	31,30±0,27	5,36±0,30	0,62±0,26
<i>Carex elata</i>	19,32±0,01	34,60±0,38	33,30±0,59	11,09±0,70	0,14±0,04
<i>Carex pseudoc.</i>	31,95±2,93	30,54±2,01	26,67±0,43	6,42±1,41	4,78±1,68
<i>Carex riparia</i>	29,84±0,64	34,86±2,26	28,60±1,11	5,62±0,39	0,47±0,05
<i>Cladium mariscus</i>	29,75±0,98	35,86±0,26	29,80±1,29	8,03±0,38	0,21±0,07
<i>Cyperus longus</i>	25,91±0,35	32,34±0,32	35,53±0,54	6,09±0,59	0,059±0,015
<i>Glyceria maxima</i>	27,98±0,42	37,01±0,36	31,32±0,22	2,49±0,14	0,56±0,08
<i>Helianthus tuberosus</i>	47,56±3,00	16,45±0,38	28,41±0,39	14,28±1,05	assenti
<i>Iris Pseudocorus</i>	55,18±0,98	9,52±0,36	28,26±0,98	6,98±0,45	0,060±0,005
<i>Juncus effusus</i>	25,31±0,31	38,63±0,44	29,88±0,35	6,17±0,34	0,010±0,004
<i>Lytrum salicaria</i>	19,65±0,15	18,49±0,11	45,65±0,31	14,36±0,21	0,010±0,005
<i>Miscanthus x giganteus</i>	18,37±0,92	30,74±0,63	42,93±1,21	6,30±1,60	0,51±0,07
<i>Phalaris arundinacea</i>	31,59±0,82	33,80±0,21	28,73±0,68	5,73±0,54	1,78±0,09
<i>Phragmites australis</i>	31,40±1,72	33,33±0,03	26,22±0,31	7,30±1,03	1,18±0,16
<i>Scirpus</i>	18,70±0,66	32,00±0,35	36,33±0,22	13,33±0,04	0,18±0,03
<i>Symphitum officinalis</i>	50,47±1,40	17,62±0,27	23,28±1,67	7,82±0,21	0,97±0,03
<i>Thalia dealbata</i>	29,98±1,37	29,82±0,34	35,19±0,69	4,37±0,16	1,15±0,15
<i>Typha latifolia</i>	31,47±0,49	30,74±0,28	32,34±0,22	5,439±0,004	0,010±0,005

Tabella 9. Composizione in fibre delle biomasse fornita dalla U.O. DAFNAE-UNIPD.

SPECIE VEGETALE	% Estrattivi	% Emicellulosa	% Cellulosa	% Lignina	% Ceneri
<i>Arundo Donax</i>	14,13±0,13	33,57±0,57	43,69±0,30	8,68±0,25	0,56±0,04
<i>Canna indica</i>	32,94±0,97	26,10±1,06	34,10±1,91	8,27±1,40	0,49±0,21
<i>Cyperus papyrus</i>	32,71±0,56	27,11±1,24	33,72±1,20	5,83±0,31	1,10±0,14
<i>Miscanthus x giganteus</i>	12,35±0,38	34,21±1,24	46,14±0,58	6,14±0,62	1,15±0,02
<i>Phragmites australis</i>	16,99±1,36	31,23±1,27	39,82±0,70	10,70±1,22	2,88±0,39
<i>Sorghum bicolor</i>	25,03±0,57	34,14±0,27	35,52±0,23	4,69±0,51	0,69±0,09
<i>Vetiveria zizanooides.</i>	18,98±0,33	39,77±0,45	34,88±0,46	5,39±0,04	0,80±0,11

Tabella 10. Composizione in fibre delle biomasse fornita dalla U.O. CSEI-CT.

Focalizziamo l'attenzione sul contenuto di cellulosa. La cellulosa è infatti il materiale fermentescibile più importante in quanto in seguito ad idrolisi produce glucosio che può essere trasformato in etanolo dal *Saccharomyces cerevisiae*. Pertanto in teoria più alto è il contenuto di cellulosa più alto potrà essere il contenuto di glucosio al termine dell'idrolisi.

Nel caso delle biomasse fornite dalla U.O. DAFNAE-UNIPD il contenuto di cellulosa varia da un quasi 46% per il *Lytrum salicaria* ad un minimo del 23% per il *Symphitum officinalis*.

Nel caso invece delle biomasse provenienti dalla U.O. CSEI-CT il contenuto di cellulosa varia da un massimo del 46% per il *Miscanthus x giganteus* ad un minimo di circa il 34% per il *Cyperus papyrus*.

Poiché tra le biomasse fornite dalle U.O. DAFNAE-UNIPD e CSEI-CT ci sono delle specie in comune, sono state scelte quelle a più alto contenuto in cellulosa. La platea finale di biomasse da utilizzare per la produzione di etanolo è quindi costituita da 23 specie ed è riassunta in tabella 11 ed in figura 8.

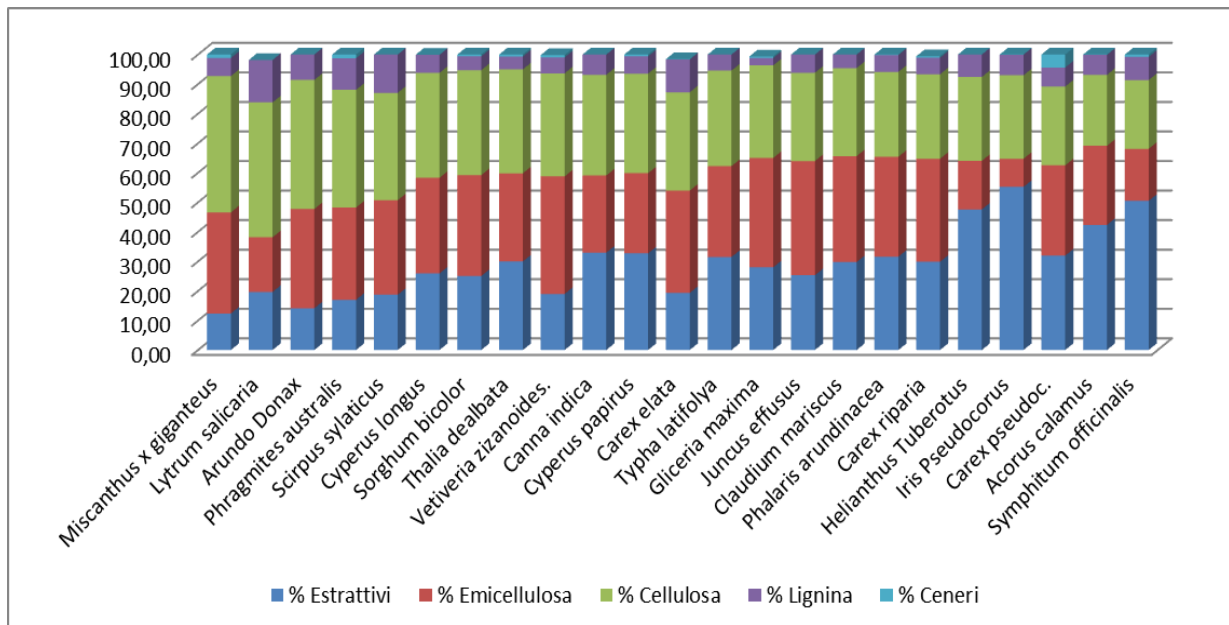


Figura 8. Istogramma della composizione percentuale delle biomasse da utilizzare per la produzione di etanolo riportate in ordine decrescente rispetto al contenuto di cellulosa ed ottenute mediante il metodo sequenziale di Van Soest.

SPECIE VEGETALE	U.O.	% Estrattivi	% Emicellulosa	% Cellulosa	% Lignina	% Ceneri
<i>Acorus calamus</i>	PD	42,33±0,74	26,78±0,69	23,98±0,52	6,77±0,5	0,13±0,07
<i>Arundo Donax</i>	CT	14,13±0,13	33,57±0,57	43,69±0,30	8,68±0,25	0,56±0,04
<i>Canna indica</i>	CT	32,94±0,97	26,10±1,06	34,10±1,91	8,27±1,40	0,49±0,21
<i>Carex elata</i>	PD	19,32±0,01	34,60±0,38	33,30±0,59	11,09±0,70	0,14±0,04
<i>Carex pseudoc.</i>	PD	31,95±2,93	30,54±2,01	26,67±0,43	6,42±1,41	4,78±1,68
<i>Carex riparia</i>	PD	29,84±0,64	34,86±2,26	28,60±1,11	5,62±0,39	0,47±0,05
<i>Cladium mariscus</i>	PD	29,75±0,98	35,86±0,26	29,80±1,29	8,03±0,38	0,21±0,07
<i>Cyperus longus</i>	PD	25,91±0,35	32,34±0,32	35,53±0,54	6,09±0,59	0,059±0,015
<i>Cyperus papyrus</i>	CT	32,71±0,56	27,11±1,24	33,72±1,20	5,83±0,31	1,10±0,14
<i>Glyceria maxima</i>	PD	27,98±0,42	37,01±0,36	31,32±0,22	2,49±0,14	0,56±0,08
<i>Helianthus tuberosus</i>	PD	47,56±3,00	16,45±0,38	28,41±0,39	14,28±1,05	assenti
<i>Iris pseudocorus</i>	PD	55,18±0,98	9,52±0,36	28,26±0,98	6,98±0,45	0,060±0,005
<i>Juncus effusus</i>	PD	25,31±0,31	38,63±0,44	29,88±0,35	6,17±0,34	0,010±0,004
<i>Lytrum salicaria</i>	PD	19,65±0,15	18,49±0,11	45,65±0,31	14,36±0,21	0,010±0,005
<i>Miscanthus x giganteus</i>	CT	12,35±0,38	34,21±1,24	46,14±0,58	6,14±0,62	1,15±0,02
<i>Phalaris arundinacea</i>	PD	31,59±0,82	33,80±0,21	28,73±0,68	5,73±0,54	1,78±0,09
<i>Phragmites australis</i>	CT	16,99±1,36	31,23±1,27	39,82±0,70	10,70±1,22	2,88±0,39
<i>Scirpus sylvaticus</i>	PD	18,70±0,66	32,00±0,35	36,33±0,22	13,33±0,04	0,18±0,03
<i>Sorghum bicolor</i>	CT	25,03±0,57	34,14±0,27	35,52±0,23	4,69±0,51	0,69±0,09
<i>Symphitum officinalis</i>	PD	50,47±1,40	17,62±0,27	23,28±1,67	7,82±0,21	0,97±0,03
<i>Thalia dealbata</i>	PD	29,98±1,37	29,82±0,34	35,19±0,69	4,37±0,16	1,15±0,15
<i>Typha latifolia</i>	PD	31,47±0,49	30,74±0,28	32,34±0,22	5,439±0,004	0,010±0,005
<i>Vetiveria zizanioides</i>	CT	18,98±0,33	39,77±0,45	34,88±0,46	5,39±0,04	0,80±0,11

Tabella 11. Composizione in fibre delle biomasse tal quali da utilizzare per la produzione di etanolo ottenute mediante il metodo sequenziale di Van Soest.

I risultati ottenuti in termini di contenuto percentuale di C,H,N, ed O, degli elementi Ca, Mg e K ed in termini di contenuto percentuale delle fibre, sono in accordo con i dati contenuti nel Phyllis database (<http://www.ecn.nl/phyllis/single.html>) e BioBIB database (<http://www.vt.tuwien.ac.at/biobib/>) per le biomasse analizzate e contenute in questi database.

4.2 PRETRATTAMENTO, IDROLISI E FERMENTAZIONE PROVE PRELIMINARI IN BEUTA

Le biomasse della tabella 11 sono sottoposte a pretrattamento così come descritto in precedenza. Al termine della prima fase di pretrattamento con acido solforico, si nota un imbrunimento sia del residuo solido sia del liquido surnatante. Il colore bruno del liquido surnatante è dovuto alla caramellizzazione di quella parte di zuccheri che si sono solubilizzati durante questa fase del pretrattamento, mentre l'imbrunimento del solido è dovuto alla alterazione struttura reticolare della lignina che è catalizzata dagli acidi. Tale fenomeno è dovuto al lungo tempo a cui sono state trattate le biomasse con acido solforico che però è necessario affinché sia solubilizzata la maggior parte dell'emicellulosa (Curreli *et al.*, 2002).

Durante la successiva fase alcalina del pretrattamento prende corpo una rottura estesa dei legami che formano la struttura tridimensionale reticolare della lignina a causa dell'azione dell'idrossido di sodio in presenza di ossigeno.

L'azione sinergica dell'idrossido di sodio e dell'ossigeno deve essere completata dall'azione del perossido di idrogeno che rimuove un'ulteriore parte della frazione della lignina. In ambiente alcalino infatti si forma l'ione idroperossido HOO^- che possiede un potenziale redox più basso di quello della corrispondente forma protonata H_2O_2 . Il più basso potenziale redox si traduce in una più alta reattività verso i centri elettrofilici ed i substrati ossidabili come la lignina ed i suoi frammenti fenolici diventano in condizione alcalina ancor più riducenti poiché si trovano in forma deprotonata (Curreli *et al.*, 1997).

L'azione alcalino ossidativa in questa fase del pretrattamento completa anche la solubilizzazione della frazione di emicellulosa ancora presente.

Poiché durante ciascuno step del pretrattamento viene solubilizzata una frazione della fibra della biomassa si registra un calo di peso dopo ciascun passaggio.

In tabella 12 sono riportati i dati del calo in peso ottenuti dopo ciascun passaggio.

Alla fine del pretrattamento, come mostrato in figura 9, si ottiene un residuo molto chiaro dalle tonalità bianco-giallastre, molto soffice, poroso ed idrofilo.

SPECIE VEGETALE	Calo peso % step Acido	Calo peso % step Alcalino	Calo peso % Totale
<i>Acorus calamus</i>	61,1	52,8	81,6
<i>Arundo donax</i>	36,6	33,2	57,7
<i>Canna indica</i>	48,6	41,3	69,8
<i>Carex elata</i>	39,9	49,8	69,8
<i>Carex pseudocorus</i>	45,6	47,5	71,4
<i>Carex ripararia</i>	47,6	47,9	72,7
<i>Cladium mariscus</i>	46,7	48,4	72,5
<i>Cyperus longus</i>	40,7	52,0	71,5
<i>Cyperus papyrus</i>	44,9	43,5	68,9
<i>Glyceria maxima</i>	50,0	42,1	71,1
<i>Helianthus tuberosus</i>	54,4	38,8	72,2
<i>Iris pseudocorus</i>	44,8	41,8	68,0
<i>Juncus effusus</i>	48,1	47,6	72,7
<i>Lythrum salicaria</i>	43,6	33,6	61,9
<i>Mischantus giganteus</i>	38,6	30,3	57,3
<i>Phalaris arundinacea</i>	48,8	43,0	70,8
<i>Phragmites australis</i>	35,6	40,3	61,5
<i>Scirpus sylvaticus</i>	42,1	51,4	71,9
<i>Sorghum bicolor</i>	48,6	43,3	71,1
<i>Symphitum officinalis</i>	56,1	49,2	77,8
<i>Thalia dealbata</i>	45,1	46,6	70,7
<i>Typhia latifolia</i>	48,2	45,2	71,6
<i>Vetiveria zizanioides</i>	40,2	34,3	60,7

Tabella 12. Calo di peso subito dalla biomassa dopo lo step acido, dopo gli step alcalino ed ossidativo e calo di peso totale.



Figura 9. Aspetto della biomassa alla fine del pretrattamento.

Il residuo delle biomasse pretrattate è stato quindi analizzato secondo il metodo di Van Soest ed i risultati ottenuti sono riportati in tabella 13.

Come si può notare osservando la tabella 13, le biomasse dopo il pretrattamento sono costituite quasi esclusivamente da cellulosa. La specie del *Cyperus papyrus* è quella che presenta dopo il pretrattamento il maggior contenuto di cellulosa con una percentuale del 91% mentre il contenuto minore lo si è ottenuto per l' *Helianthus tuberosus* con poco più del 66%. Gli estrattivi, ovvero carboidrati solubili (comprese le pectine), proteine, lipidi, sostanze minerali solubili, sono quasi completamente allontanati durante il pretrattamento e la loro percentuale sul residuo finale è compresa tra il 2 ed il 6% per la maggior parte delle specie. Risulta essere intorno al 10% per *Symphythum officinalis* ed *Acorus calamus* che sono le specie che ne possiedono la percentuale maggiore nella biomassa di partenza.

Anche l'emicellulosa è quasi completamente solubilizzata. Il suo contenuto sulle biomasse residue varia tra il minimo del 4,83% dell'*Acorus calamus* ad un massimo del 9,60% per lo *Scirpus sylvaticus*.

SPECIE VEGETALE	% Estrattivi	% Emicellulosa	% Cellulosa	% Lignina	% Ceneri
<i>Acorus calamus</i>	8,32±0,42	5,35±0,82	77,97±2,82	9,14±1,24	-
<i>Arundo donax</i>	2,79±0,93	8,55±2,22	79,22±3,00	8,98±1,00	0,02±0,005
<i>Canna indica</i>	4,43±0,15	8,14±1,00	84,33±0,40	3,23±0,0,60	-
<i>Carex elata</i>	5,30±0,42	7,41±0,82	79,97±2,82	7,72±1,24	-
<i>Carex pseudocorus</i>	4,73±0,09	5,15±0,20	80,53±9,00	2,64±0,33	12,27±2,08
<i>Carex ripararia</i>	5,11±0,18	6,66±0,60	85,97±0,30	2,38±0,20	-
<i>Cladium mariscus</i>	4,23±0,61	6,70±1,00	84,00±2,00	5,29±2,00	-
<i>Cyperus longus</i>	3,28±0,42	5,80±0,82	88,93±2,82	2,06±1,24	-
<i>Cyperus papyrus</i>	2,13±1,25	4,83±0,90	91,25±2,00	1,77±0,50	0,050±0,002
<i>Glyceria maxima</i>	3,74±0,13	5,34±0,40	87,52±2,30	3,23±0,70	0,10±0,05
<i>Helianthus tuberosus</i>	5,00±1,33	5,63±0,09	66,86±0,88	24,21±1,39	-
<i>Iris pseudocorus</i>	6,73±0,71	5,96±1,00	77,95±1,00	11,69±4,00	0,18±0,06
<i>Juncus effusus</i>	4,69±0,06	5,02±0,20	87,30±2,67	3,30±2,70	-
<i>Lythrum salicaria</i>	3,77±0,48	7,98±0,20	74,79±3,28	14,38±4,50	-
<i>Mischantus giganteus</i>	3,57±0,60	7,51±1,35	81,67±1,93	7,30±1,09	-
<i>Phalaris arundinacea</i>	5,85±0,20	6,50±0,60	82,09±1,00	4,68±0,0,50	1,30±0,05
<i>Phragmites australis</i>	3,80±0,40	7,98±1,00	81,63±2,68	10,23±0,45	-
<i>Scirpus sylvaticus</i>	6,77±0,27	9,60±0,60	84,98±5,00	2,80±0,20	-
<i>Sorghum bicolor</i>	4,91±0,32	6,90±0,50	83,08±0,83	6,04±0,83	-
<i>Symphitum officinale</i>	11,41±0,35	6,16±0,50	74,41±1,00	4,91±0,0,30	2,39±0,084
<i>Thalia dealbata</i>	5,09±0,33	8,33±1,00	83,34±2,00	4,80±0,50	-
<i>Typhja latifolia</i>	5,45±0,42	5,57±0,82	80,71±2,82	8,74±1,24	-
<i>Vetiveria zizanoioides</i>	4,74±0,48	7,70±1,52	75,40±5,30	9,21±2,00	-

Tabella 13. Composizione in fibre delle biomasse pretrattate utilizzare per la produzione di etanolo ottenute mediante il metodo sequenziale di Van Soest.

La lignina è anche essa quasi completamente solubilizzata durante il pretrattamento. Il suo contenuto percentuale sulla biomassa residua varia da un minimo del 1,77% misurato per il *Cyperus papyrus* ad un massimo del 14,38% per il *Lythrum salicaria*. Osservando la figura 10 che riporta in grafico la composizione delle biomasse pretrattate e confrontandola con la figura 8, si può notare come il risultato finale sia quello di una concentrazione della cellulosa nella biomassa residua.

L'effetto radicale del pretrattamento sulla composizione delle biomasse può essere anche visualizzato mediante l'ausilio delle componenti principali. Se usiamo come matrice di dati le composizioni percentuali delle biomasse tal quali prima e dopo il pretrattamento otteniamo due distinti gruppi: uno costituito totalmente dalle biomasse pretrattate e l'altro invece dalle

biomasse tal quali così come mostrato in figura 11. La varianza spiegata con le prime due componenti principali è del 96% come mostrato dal grafico degli autovalori di figura12.

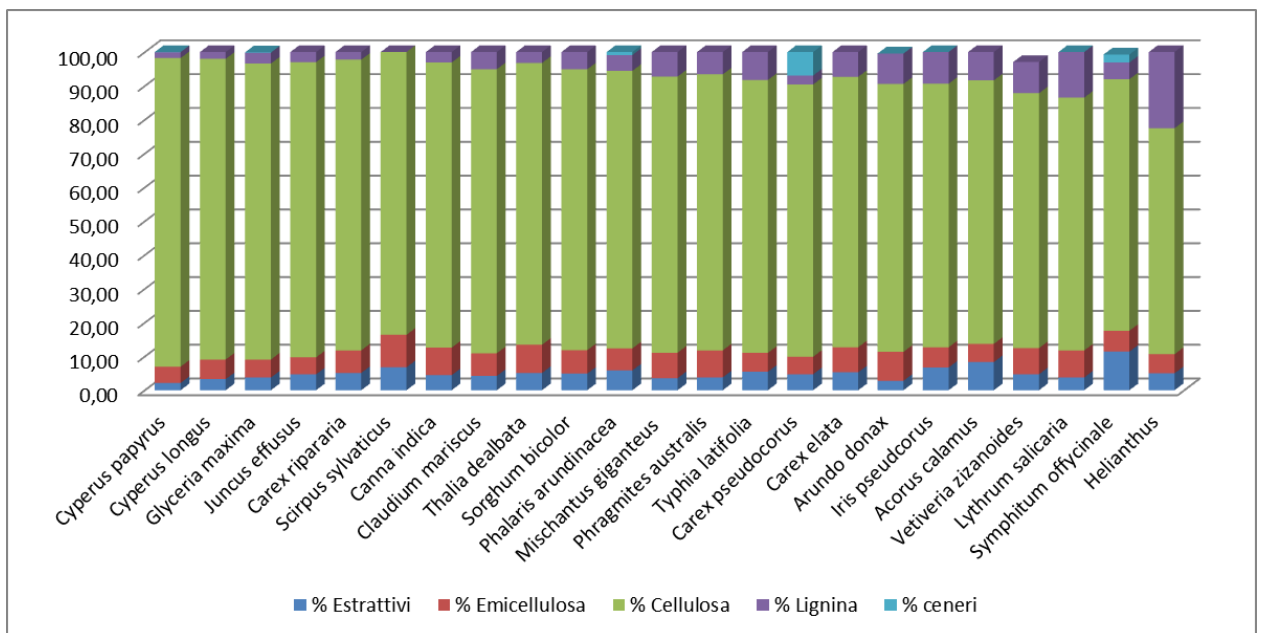


Figura 10. Istogramma delle composizioni percentuali in fibre delle biomassa pretrattate ottenute mediante il metodo sequenziale di Van Soest.

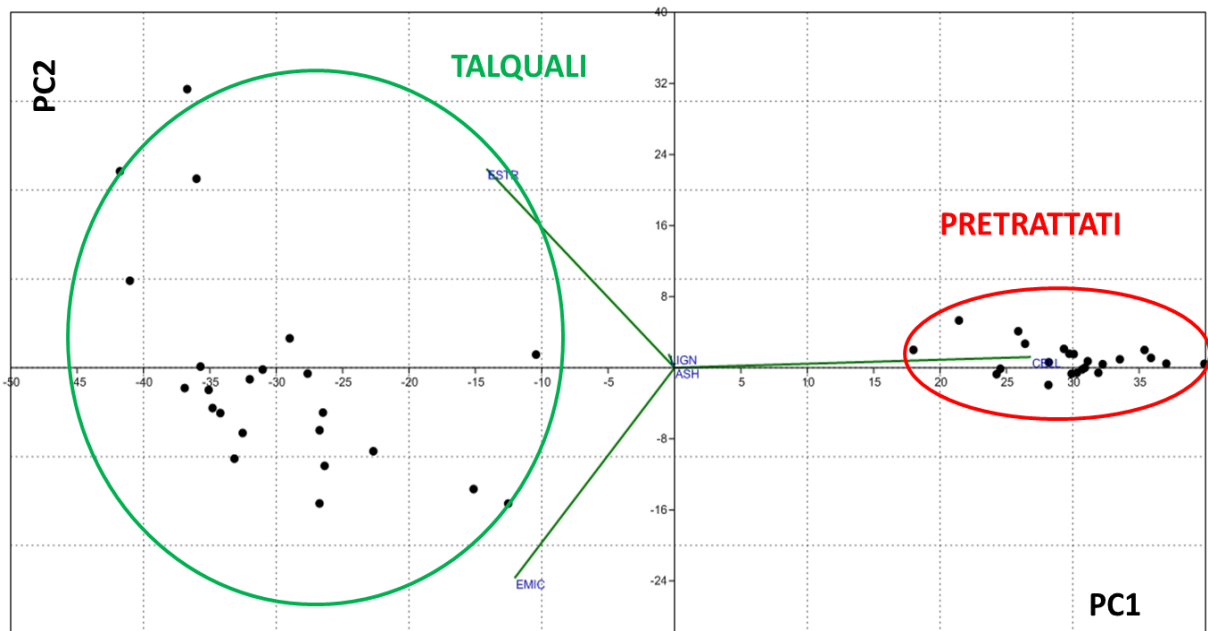


Figura 11: Scatter plot delle prime due componenti principali ottenuto utilizzando come matrice di dati le composizioni in fibra delle biomasse prima e dopo il pretrattamento.

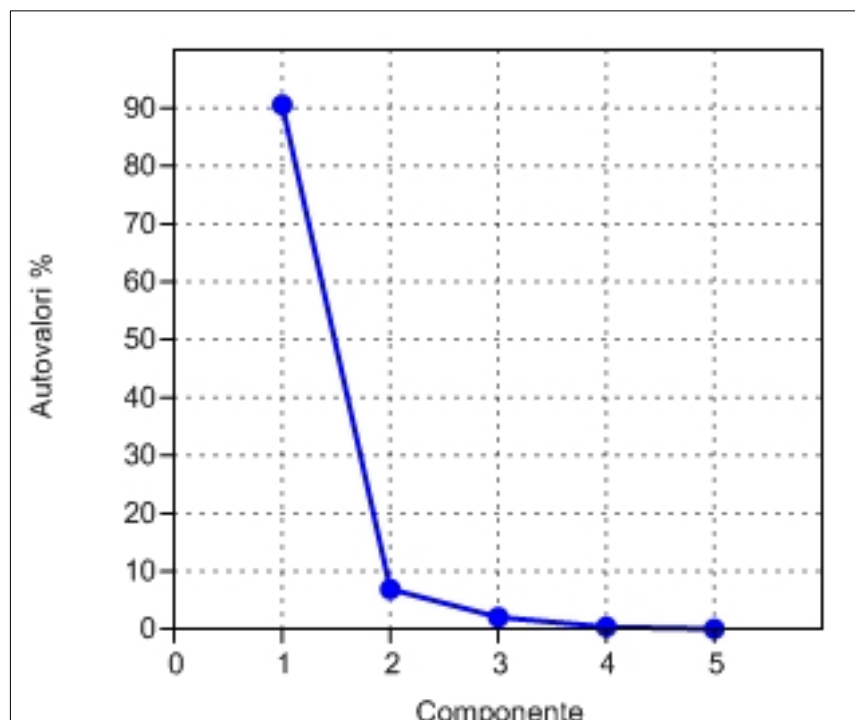


Figura 12: Grafico degli autovalori delle componenti principali ottenuto utilizzando come matrice di dati le composizioni in fibra delle biomasse prima e dopo il pretrattamento. La varianza spiegata dalle prime due componenti principali è del 96%.

In tabella 14 sono riassunte quindi le percentuali di solubilizzazione dell'emicellulosa e della lignina nonché le percentuali di recupero della cellulosa dalla biomassa di partenza.

SPECIE VEGETALE	% Solub. Emic.	% Recup. Cell.	% Solub. Lign.
<i>Acorus calamus</i>	96	61	71
<i>Arundo donax</i>	90	75	54
<i>Canna indica</i>	91	75	88
<i>Carex elata</i>	94	72	81
<i>Carex pseudocorus</i>	95	86	86
<i>Carex ripararia</i>	95	82	88
<i>Cladium mariscus</i>	95	78	82
<i>Cyperus longus</i>	95	71	90
<i>Cyperus papyrus</i>	95	84	91
<i>Glyceria maxima</i>	93	80	62
<i>Helianthus tuberosus</i>	91	63	53
<i>Iris pseudocorus</i>	79	90	69
<i>Juncus effusus</i>	96	92	94
<i>Lythrum salicaria</i>	79	78	49
<i>Mischantus giganteus</i>	87	78	64
<i>Phalaris arundinacea</i>	95	82	77
<i>Phragmites australis</i>	90	83	88
<i>Scirpus sylvaticus</i>	94	66	95
<i>Sorghum bicolor</i>	94	64	64
<i>Symphitum officinalis</i>	92	79	86
<i>Thalia dealbata</i>	91	73	66
<i>Typhia latifolia</i>	95	71	61
<i>Vetiveria zizanioides</i>	92	86	33

Tabella 14. Valori medi delle percentuali di solubilizzazione della emicellulosa, della lignina e del recupero della cellulosa ottenute alla fine del pretrattamento di ciascuna specie vegetale.

Il pretrattamento è stato molto efficace in termini di solubilizzazione della emicellulosa ed infatti per la maggior parte delle specie la sua solubilizzazione supera il 90%. Buone sono anche le percentuali di cellulosa recuperata dalla biomassa di partenza. Il valore medio è di circa l'80% di cellulosa recuperata. La percentuale massima di cellulosa recuperata la si ottiene per lo *Juncus effusus* con oltre il 90% di cellulosa recuperata, mentre il minimo lo si ottiene per l'*Acorus calamus* con un valore del 61%.

Più variabilità presentano le percentuali di solubilizzazione della lignina, probabilmente dovuta alla natura ed alla composizione estremamente variabile di questo eteropolimero con la specie vegetale. Il valore medio di lignina solubilizzata è del 74%. Il valore massimo di solubilizzazione lo si ottiene per lo *Scirpus sylvaticus* mentre il minimo per la *Vetiveria zizanioides*.

Il calo di peso totale registrato alla fine del pretrattamento è coerente con l'ipotesi che l'effetto finale del pretrattamento sia la solubilizzazione quasi totale della emicellulosa e lignina nonché l'allontanamento quantitativo degli estrattivi. Riportando in grafico infatti il calo peso totale contro la somma delle quantità di estrattivi, emicellulosa e lignina solubilizzate, si ottiene una retta con un coefficiente di correlazione $R^2=0,8$ come mostrato in figura 13.

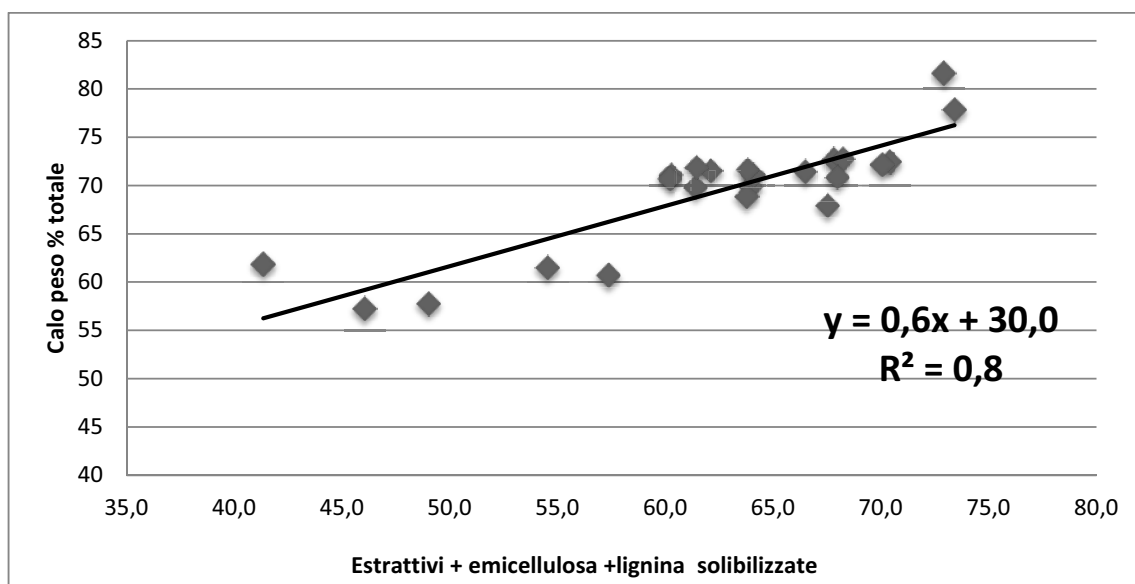


Figura 13. Correlazione tra il calo di peso subito dalla biomassa dopo il pretrattamento e le quantità solubilizzate di estrattivi, emicellulosa e lignina.

Alla fine del pretrattamento la biomassa si presenta molto porosa e idrofila, caratteristiche che ben si prestano all'azione degli enzimi.

In tabella 15 sono riportati i valori medi delle concentrazioni di glucosio ottenute dopo 72 ore di idrolisi, i valori medi di etanolo dopo 24 ore di fermentazione così come descritto nella sezione materiali e metodi, le rese di glucosio ed etanolo ottenute espresse come percentuale della resa teorica, la resa della fermentazione ovvero la percentuale di quanto glucosio prodotto durante l'idrolisi è convertito in etanolo e la resa di etanolo espressa come grammi di etanolo per 100 grammi della sostanza secca iniziale.

SPECIE VEGETALE	GLU g/l	EtOH g/l	Resa GLU (% teorica)	Resa Fermen.	Resa EtOH (% teorica)	g(EtOH)/ 100g(SS)
<i>Acorus calamus</i>	33,0±0,3	10,3±0,2	77±7	61,2±11,1	47±7	21,2±2,2
<i>Arundo donax</i>	13,7±0,4	4,1±0,4	32±1	58,9±3,8	19±2	4,8±0,4
<i>Canna indica</i>	33,7±6,2	12,3±0,3	73±12	72,6±11,7	52±1	17,1±0,4
<i>Carex elata</i>	21,5±0,3	10,0±0,2	49±7	91,2±11,1	45±7	14,0±2,3
<i>Carex pseudocorus</i>	24,2±9,6	9,4±2,2	55±1	75,8±16,0	42±9	13,4±3,2
<i>Carex ripararia</i>	38,5±4,2	17,4±0,4	81±9	89,0±7,7	72±2	25,3±0,6
<i>Cladium mariscus</i>	28,4±2,9	11,7±1,1	61±6	82,0±15,8	50±5	17±1,6
<i>Cyperus longus</i>	37,0±0,3	14,8±0,2	76±7	78,4±11,1	59±7	18,4±2,3
<i>Cyperus papyrus</i>	35,1±2,5	13,8±1,4	70±5	77,8±13,4	54±6	19,0±2,0
<i>Glyceria maxima</i>	33,5±4,9	16,9±5,5	70±10	97,6±17,9	69±22	22,7±6,3
<i>Helianthus tuberosus</i>	12,2±0,9	4,1±1,2	24±2	67,2±4,4	16±5	5,6±1,4
<i>Iris pseudocorus</i>	33,7±4,1	11,4±2,3	79±9	65,9±5,3	52±10	15,5±3,1
<i>Juncus effusus</i>	25,8±5,2	16,2±2,8	54±11	123,1±4,0	66±11	22,4±3,8
<i>Lythrum salicaria</i>	8,7±1,1	3,5±0,7	21±3	80,8±25,5	17±3	3,2±1,3
<i>Mischantus giganteus</i>	21,1±1,6	6,2±0,9	47±4	57,6±3,8	27±4	7,5±0,4
<i>Phalaris arundinacea</i>	29,4±3,7	13,9±1,2	65±8	94,4±19,9	61±5	19,2±2,7
<i>Phragmites australis</i>	16,5±0,8	7,4±2,0	37±2	101,1±13,2	29±9	8,8±1,0
<i>Scirpus sylvaticus</i>	28,6±1,6	6,6±2,4	61±4	45,9±19	28±9	9,5±3,4
<i>Sorghum bicolor</i>	23,7±6,2	10,2±2,8	52±13	83,9±1,0	44±12	14,2±4,7
<i>Symphitum officinalis</i>	33,8±0,4	11,5±1,1	83±1	66,4±6,9	55±6	19,0±2,7
<i>Thalia dealbata</i>	30,8±5,2	13,2±0,3	67±11	84,3±5,6	56±6	18,1±1,8
<i>Typhia latifolia</i>	33,1±0,3	11,8±0,2	75±7	69,9±11,1	52±7	16,9±2,3
<i>Vetiveria zizanioides</i>	21,4±3,5	9,1±0,5	52±8	84,0±9,2	43±2	9,6±2,6

Tabella 15. Valori di concentrazione di glucosio ed etanolo raggiunti alla fine della idrolisi e della fermentazione. Valori delle rese di glucosio ed etanolo espresse come percentuali della resa teorica. Valori della resa della fermentazione e grammi di etanolo per 100 grammi della sostanza secca iniziale.

Osservando la tabella 15 si nota che la miglior resa in termini di produzione di glucosio la si è avuta per il *Symphithum officinalis* e la *Carex riparia* rispettivamente con i valori dell' 83 e 81%, mentre il valore più basso lo si è avuto *Lythrum salicaria* con il 21%. La più alta produzione di etanolo invece la si è avuta con la *Carex riparia* con il valore del 72% mentre la più bassa ancora per il *Lythrum salicaria*.

Se confrontiamo la tabella 13 con la tabella 15 notiamo che biomasse pretrattate che hanno simili contenuto in cellulosa possono dare risultati diversi in termini di resa di produzione di glucosio ed etanolo Tale differenza può essere messa in relazione con il contenuto di lignina (Isci *et al.*, 2008). Per far questo utilizziamo il coefficiente di correlazione di Pearson.

L'indice di correlazione di Pearson, anche detto coefficiente di correlazione di Pearson (o di Bravais-Pearson) tra due variabili aleatorie, è un coefficiente che esprime la linearità tra la loro covarianza e il prodotto delle rispettive deviazioni standard. Nell'analisi di correlazione di Pearson date due variabili statistiche X e Y, indice di correlazione di Pearson è definito come la loro covarianza divisa per il prodotto delle deviazioni standard delle due variabili ed indicato ρ_{xy} . Il coefficiente assume sempre valori compresi tra -1 e d 1. Un valore pari a -1 indica una correlazione negativa perfetta mentre un valore pari a +1 si parla di correlazione positiva perfetta. Se ρ_{xy} è uguale a zero le due variabili non sono correlate.

Come matrice di dati utilizziamo i contenuti in lignina sulla biomassa pretrattata di tabella 13 e la resa in glucosio espressa come percentuale della teorica di tabella 15. In questo caso il coefficiente di Pearson restituito è pari a -0,6 che indica una correlazione negativa tra contenuto in lignina e resa di glucosio. Eseguendo un test t di student a con 21 gradi di libertà (n-2 gradi di libertà dove n è il numero delle specie vegetali) si trova che la relazione è significativa per un livello di significatività $p < 0,01$. Questo è un risultato atteso in quanto è noto che la lignina crea ostacoli alla idrolisi limitando l'accessibilità degli enzimi idrolitici ai siti attivi. La lignina infatti può legarsi con gli enzimi e competere così con la cellulosa così che un aumento del rapporto lignina/cellulosa può risultare in una diminuzione dei legami cellulosa-enzima con conseguente diminuzione della attività enzimatica (Smith *et al.*, 2010)

Questo si ripercuote anche sulle rese di etanolo, poiché quanto più alta sarà alla fine dell'idrolisi la concentrazione in glucosio tanto maggiore sarà la possibilità di avere alla fine della fermentazione. Infatti se calcoliamo il coefficiente di Pearson usando come matrici di dati la resa in glucosio e quella in etanolo, viene restituito il valore di +0,8 che indica come atteso una forte correlazione positiva tra le due rese.

Ci sono inoltre altri fattori che possono essere presi in considerazione per spiegare le diverse rese in glucosio ed etanolo.

Anche se non sono state fatte delle misure in tal senso, è noto che il grado cristallino della cellulosa (CrI), il suo grado di polimerizzazione, la misura dei suoi pori che si traduce in una superficie accessibile da parte degli enzimi sono tutti fattori che influenzano la resa di idrolisi e quindi di conseguenza la resa in etanolo (Alvira *et al.*, 2010).

E' stato osservato in alcuni casi che il pretrattamento sebbene aumenti l'idrolizzabilità della biomassa può aumentarne il grado cristallino della cellulosa, poiché ci può essere una rimozione o diminuzione della cellulosa amorfa nella biomassa che è più facilmente accessibile. Questo è vero in particolare per trattamenti come la *steam explosion* (Mansfield *et al.*, 1999) mentre pretrattamenti a più alti pH sembrano avere un effetto minore in tal senso (Kumar *et al.*, 2009). Il grado di polimerizzazione è legato al grado cristallino e dipende dalla natura del substrato. Durante l'idrolisi enzimatica le endoglucanasi tagliano un sito interno delle catene di cellulosa preferendo quelle meno ordinate facendo diminuire il grado di polimerizzazione dei substrati cellulosici. I diversi pretrattamenti agiscono in maniera diversa sulla lunghezza delle catene e sembra che in tal senso la rimozione della emicellulosa abbia un effetto più importante sul grado di polimerizzazione della cellulosa rispetto alla rimozione della lignina (Kumar *et al.*, 2009). La rimozione dell'emicellulosa inoltre aumenta il diametro dei pori del substrato aumentando la probabilità della cellulosa di essere idrolizzata (Chandra *et al.*, 2007) poiché è più probabile che le cellulasi rimangano intrappolate nei pori se l'area interna è più grande di quella esterna (Zang and Lynd, 2004).

Alla luce di quanto detto, anche se le biomasse dopo il pretrattamento hanno un contenuto simile in cellulosa, la resa in termini di produzione di glucosio e conseguentemente di etanolo può variare per le diverse caratteristiche fisiche che questa può presentare alla fine del pretrattamento in termini di grado cristallino, grado di polimerizzazione e porosità. Ulteriori analisi sono quindi necessarie per stabilire il legame tra questi tre parametri nella cellulosa nella biomassa iniziale ed alla fine del pretrattamento e le rese di glucosio ed etanolo.

Terminata questa fase di screening sulle potenzialità di produzione di etanolo dalle biomasse selezionate sfalciate allo stadio di maturazione, sono stati condotti degli esperimenti su alcune specie sfalciate invece ad uno stadio più giovane della pianta.

Le biomasse selezionate sono il *Symphitum officinalis* e la *Carex riparia* che hanno dato le migliori rese di idrolisi e fermentazione, il *Miscanthus x giganteus* e l'*Arundo donax* perché sono le specie che hanno avuto le migliori rese in termini di produttività.

Nelle tabelle 16÷20 riportiamo rispettivamente il calo di peso subito dopo ogni step di pretrattamento, i dati composizionali delle biomasse tagliate di fresco prima e dopo il

pretrattamento, i recuperi delle fibra dopo il pretrattamento e le rese di produzione di glucosio ed etanolo.

SPECIE VEGETALE	Calo peso % step Acido	Calo peso % step Alcalino	Calo peso % Totale
<i>Miscanthus x giganteus</i>	40,1	30,5	58,4
<i>Arundo donax</i>	46,4	30,8	62,9
<i>Carex riparia</i>	48,9	40,8	69,8
<i>Symphitum officinalis</i>	44,5	59,5	77,3

Tabella 16. Calo di peso subito dalla biomassa sfalciata fresca dopo lo step acido, dopo gli step alcalino ed ossidativo e calo di peso totale.

SPECIE VEGETALE	% Estrattivi	% Emicellulosa	% Cellulosa	% Lignina	% Ceneri
<i>Miscanthus x giganteus</i>	20,97±0,97	31,70±0,48	41,50±0,42	6,48±0,69	0,34±0,10
<i>Arundo donax</i>	30,24±0,25	29,99±1,74	35,66±0,45	5,45±0,78	1,12±0,15
<i>Carex riparia</i>	29,49±0,69	33,96±1,22	32,53±0,34	3,37±0,98	0,46±0,18
<i>Symphitum officinalis</i>	56,30±1,10	13,74±0,64	16,37±0,64	14,40±2,41	0,61±0,29

Tabella 17. Composizione delle biomasse tal quali sfalciate fresche ottenute mediante l'analisi sequenziale di Van Soest ed espresse come percentuali della sostanza secca.

SPECIE VEGETALE	% Estrattivi	% Emicellulosa	% Cellulosa	% Lignina	% Ceneri
<i>Miscanthus x giganteus</i>	3,13±1,10	4,40±0,73	84,27±0,30	8,06±0,68	-
<i>Arundo donax</i>	2,60±0,41	5,14±0,66	76,11±5,14	15,31±5,32	0,28±0,12
<i>Carex riparia</i>	1,49±0,16	3,47±1,05	90,96±0,90	3,40±0,38	0,34±0,12
<i>Symphitum officinalis</i>	23,20±1,99	4,52±0,03	58,80±2,67	10,99±1,07	2,49±0,43

Tabella 18. Composizione delle biomasse sfalciate fresche pretrattate ottenute mediante l'analisi sequenziale di Van Soest ed espresse come percentuali della sostanza secca.

.

SPECIE VEGETALE	% Solub. Emic.	% Recup. Cell.	% Solub. Lign.
<i>Miscanthus x giganteus</i>	95	76	53
<i>Arundo donax</i>	94	70	34
<i>Carex riparia</i>	97	75	73
<i>Symphitum officinalis</i>	94	70	85

Tabella 19. Solubilizzazione di lignina ed emicellulosa e recupero medio della cellulosa per le specie sfalciate fresche.

SPECIE VEGETALE	GLU	EtOH	Resa	Resa	Resa	g(EtOH)/
	g/l	g/l	GLU	Fermentazione	EtOH	100g(SSI)
<i>Miscanthus x giganteus</i>	21,5±4,2	11,8±0,2	51±6	98,6±12,7	50±1	15,1±2,0
<i>Arundo donax</i>	19,3±1,8	8,4±2,9	46±4	84,2±21,1	39±13	10,4±3,5
<i>Carex riparia</i>	24,4±1,4	11,6±0,8	49±3	92,6±1,1	48±3	16,2±0,8
<i>Symphitum officinalis</i>	14,3±0,4	6,8±0,4	44±4	93,2±7,3	41±4	10,5±0,4

Tabella 20. Valori di concentrazione di glucosio ed etanolo raggiunti alla fine della idrolisi e della fermentazione. Valori delle rese di glucosio ed etanolo espresse come percentuali della resa teorica. Valori della resa della fermentazione e grammi di etanolo per 100 grammi della sostanza secca iniziale.

Analogamente a quanto visto per le specie a mature, il calo di peso è coerente con le percentuali di solubilizzazione durante i vari step di lignina, emicellulosa ed estrattivi. Mettendo quindi in relazione il calo di peso totale che subisce la biomassa dopo il pretrattamento con la somma delle percentuali perse di estrattivi, lignina ed emicellulosa si ottiene una retta con un coefficiente $R^2=0,94$ come mostrato in figura 14.

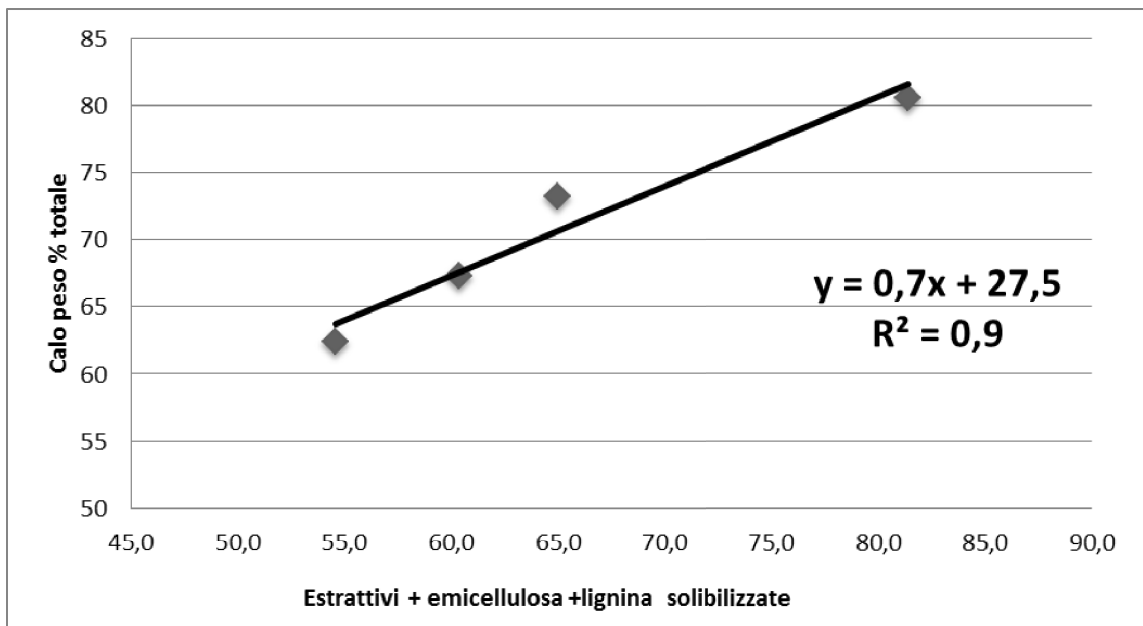


Figura 14. Correlazione tra il calo di peso subito dalla biomassa sfalciata fresca dopo il pretrattamento e le quantità solubilizzate di estrattivi, emicellulosa e lignina.

In figura 15 è mostrato il confronto tra le composizioni delle specie ai due diversi tempi di sfalcio indicando con la sigla TF le specie con un sfalcio più recente.

Ad eccezione della specie *Carex Riparia*, si nota che le specie con uno sfalcio più recente possiedono più estrattivi e meno fibra rispetto alle specie sfalciate a maturazione della pianta.

In un recente lavoro (Le Ngoc Huyen *et al.*, 2010), tale comportamento è dovuto per il *Miscanthus x giganteus* alla perdita di foglie le quali possiedono le concentrazioni maggiori di sostanze solubili rispetto alle altre parti della pianta (Burner *et al.*, 2009).

Nelle figure 16, 17 e 18 sono riportati i valori di emicellulosa, cellulosa e lignina per le specie con sfalcio recente rispetto a quelle sfalciate a maturazione. Le specie tagliate di fresco presentano un contenuto di emicellulosa e cellulosa minore rispetto a quelle tagliate a maturazione. Anche il contenuto di lignina è minore per la *Carex riparia* e l'*Arundo donax* mentre è pressoché identico per il *Miscanthus x giganteus*. Per tale specie le differenze in lignina iniziano a diventare significative solo dopo il quarto anno di età (Le Ngoc Huyen *et al.*, 2010) che è una differenza maggiore rispetto a quelle del *Miscanthus x giganteus* usato in questo lavoro. L'unico dato anomalo è quello proveniente dal *Symphitum officinalis* il cui taglio fresco presenta più lignina di quello sfalcio a maturazione. Questo è dovuto probabilmente alle difficoltà analitiche durante l'analisi di Van Soest. Nell'ultimo passaggio

con acido solforico concentrato al 72% si forma infatti una soluzione molto densa di difficile filtrazione.

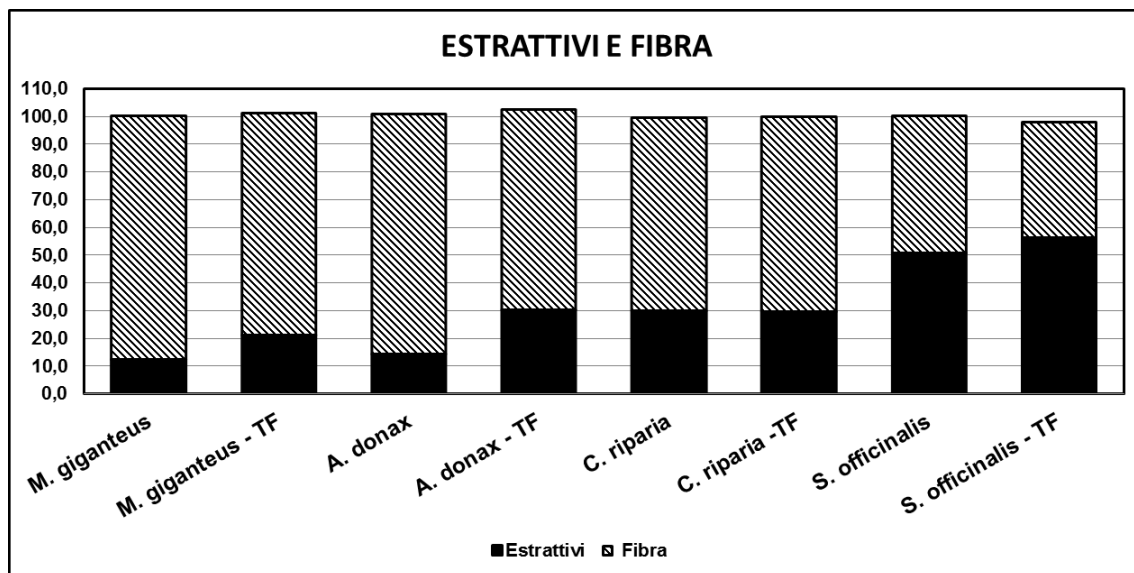


Figura 15. Confronto tra le quantità di estrattivi e le quantità di fibra insolubile tra le specie a taglio unico (a maturazione) e le specie tagliate di fresco ottenute con il metodo di Van Soest ed espresse come percentuale della sostanza secca.

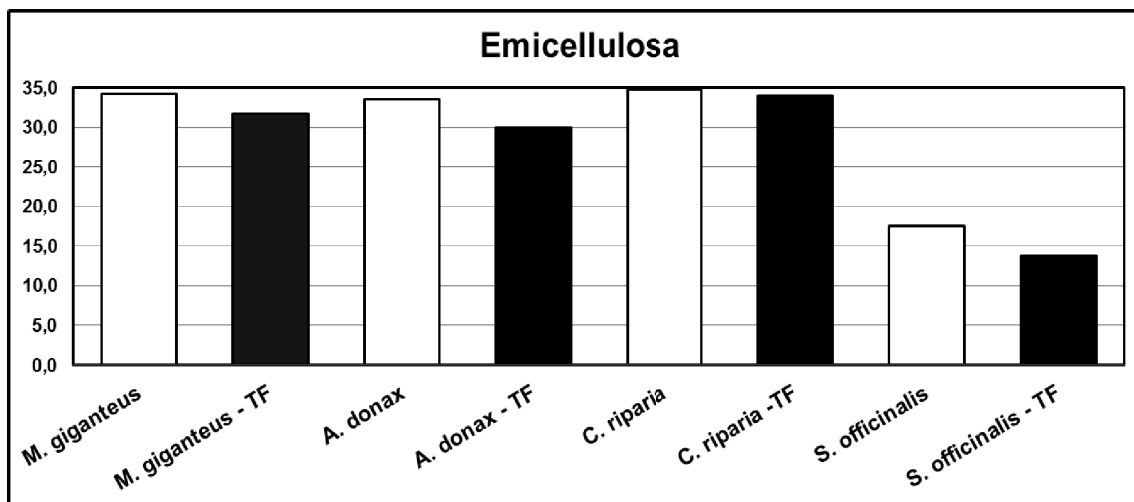


Figura 16. Confronto tra le quantità di emicellulosa tra le specie a taglio unico (a maturazione) e le specie tagliate di fresco espresse come percentuale della sostanza secca ottenute con il metodo di Van Soest.

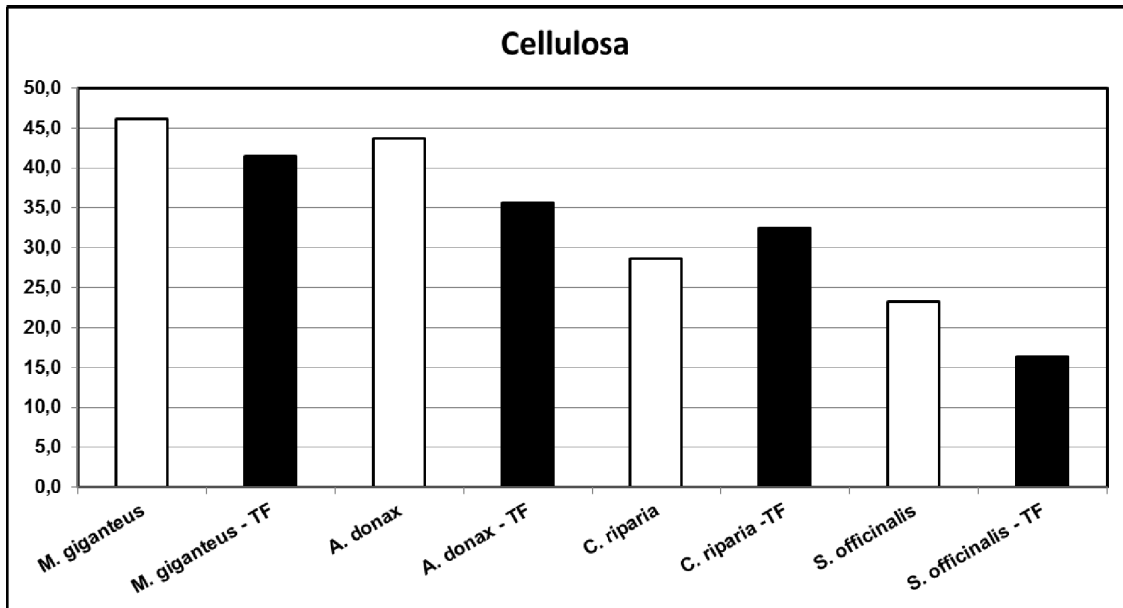


Figura 17. Confronto tra le quantità di cellulosa tra le specie a taglio unico (a maturazione) e le specie tagliate di fresco espresse come percentuale della sostanza secca ottenute con il metodo di Van Soest.

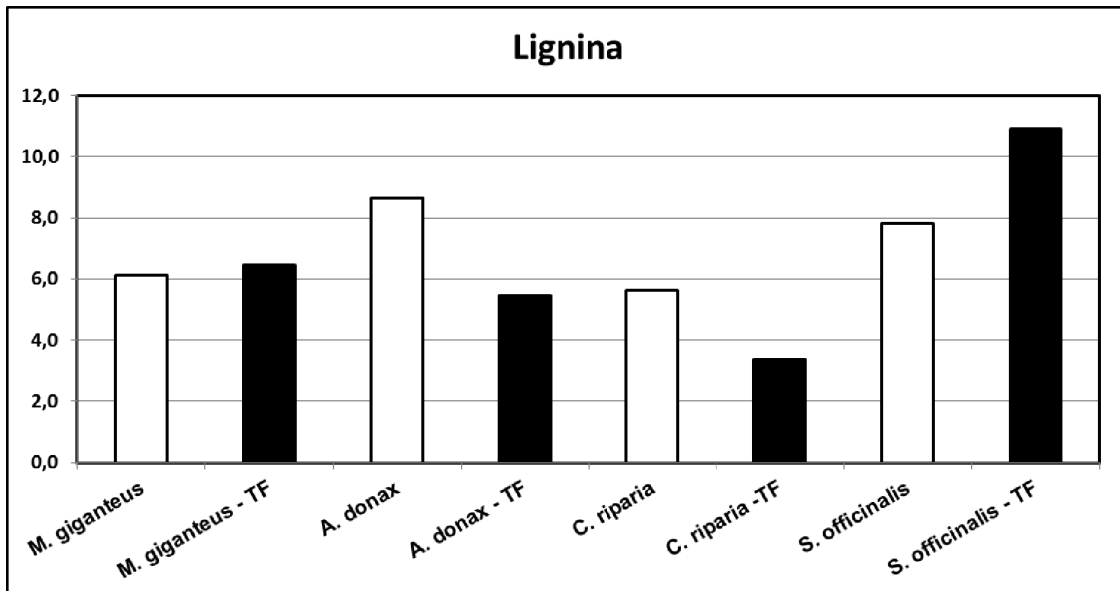


Figura 18. Confronto tra le quantità di lignina tra le specie a taglio unico (a maturazione) e le specie tagliate di fresco espresse come percentuale della sostanza secca ottenute con il metodo di Van Soest.

In figura 19 è riportato l'effetto del pretrattamento sulle specie tagliate di fresco rispetto a quelle a tagliate a maturazione.

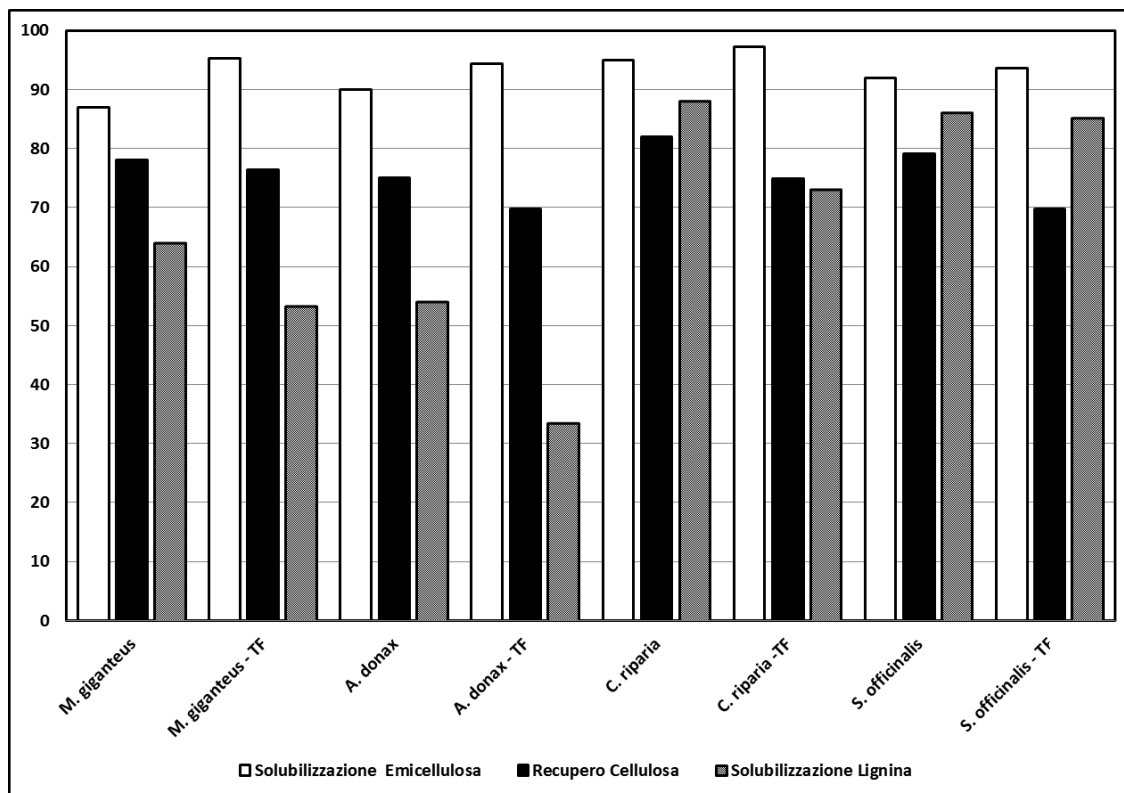


Figura 19. Confronto dell' effetto del pretrattamento tra le specie a taglio unico (a maturazione) e le specie tagliate di fresco.

Anche se le differenze sono minime, per le specie tagliate di fresco si ha una maggior rimozione della emicellulosa, un minore recupero di cellulosa ed una minore solubilizzazione della lignina.

Nelle figure 20, 21, 22 e 23 riportiamo le rese di glucosio ed etanolo espresse come percentuale della resa teorica e la resa di etanolo in grammi per grammo per 100g di sostanza secca. Per il *Miscanthus x giganteus* (Le Ngoc Huyen *et al.*, 2010) e per l'*Arundo donax* le specie tagliate di fresco producono maggiori rese in termini di produzione di glucosio durante l'idrolisi e di etanolo durante la fermentazione nonostante abbiano quantità minori di fibra.

Per la *Carex riparia* e per *Symphytum officinalis* si osserva il comportamento opposto.

Difficile spiegare tale diverso comportamento solo in base ai dati di composizione delle fibre prima e dopo il pretrattamento. Molto probabilmente entrano in gioco altri fattori come il grado di cristallizzazione, il grado di polimerizzazione della cellulosa e/o fenomeni di

assorbimento dell'enzima sulla biomassa che influenzano notevolmente l'idrolisi della stessa (Yoshida *et al.*, 2008).

Ulteriori analisi sono quindi necessarie per stabilire il legame tra questi tre parametri e le rese di glucosio ed etanolo.

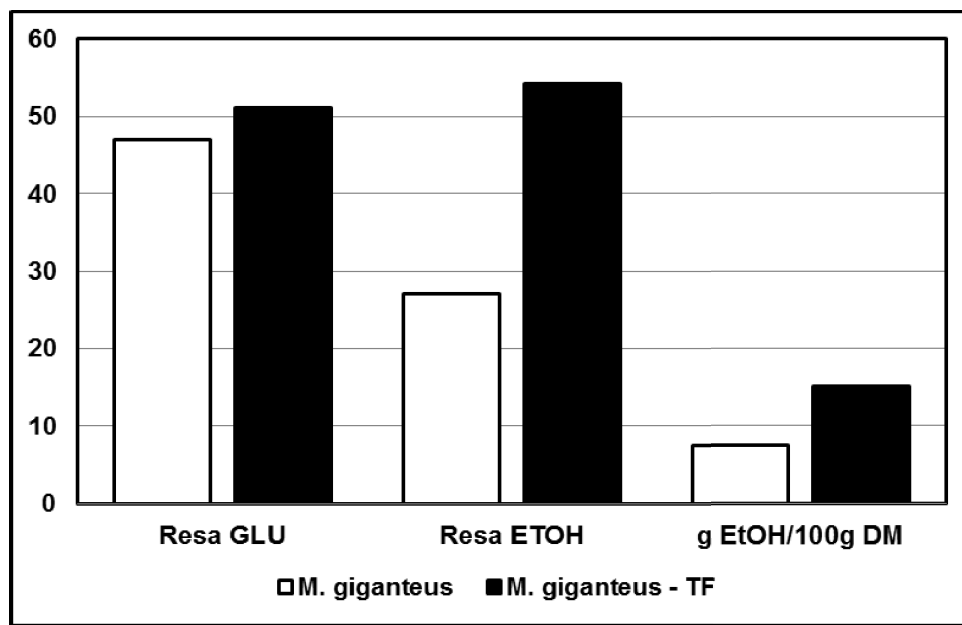


Figura 20. Confronto fra le rese raggiunte durante l'idrolisi e la fermentazione di glucosio ed etanolo per il *M. x giganteus* sfalciato a maturazione e quello tagliato di fresco

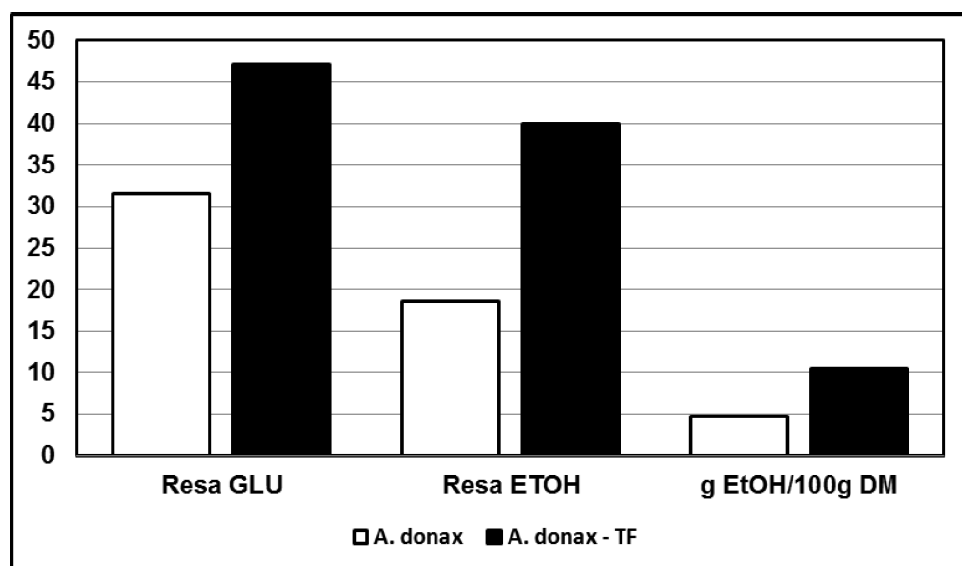


Figura 21. Confronto fra le rese raggiunte durante l'idrolisi e la fermentazione di glucosio ed etanolo per l'*A. donax* sfalciato a maturazione e quello tagliato di fresco.

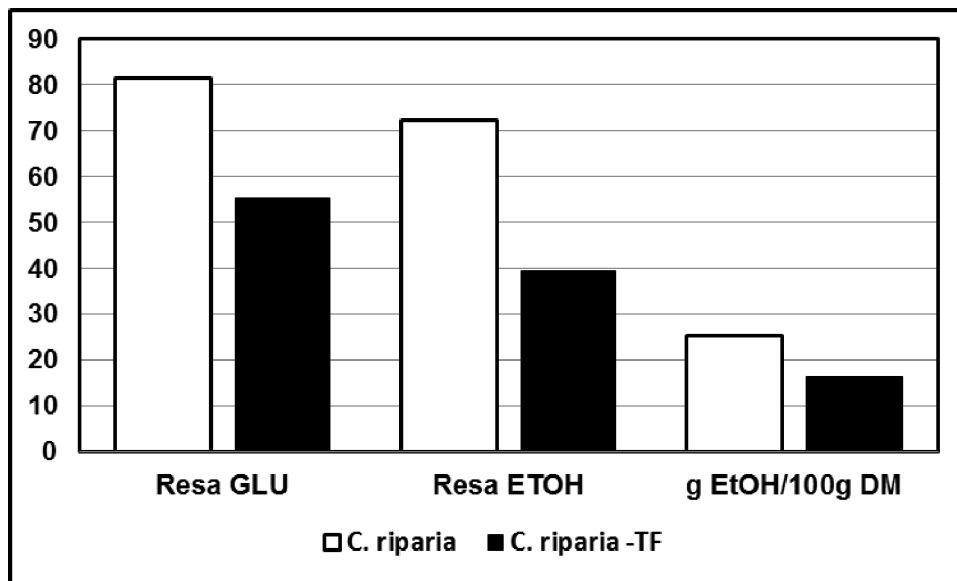


Figura 22. Confronto fra le rese raggiunte durante l'idrolisi e la fermentazione di glucosio ed etanolo per la *Carex riparia* sfalciata a maturazione e quella tagliata di fresco.

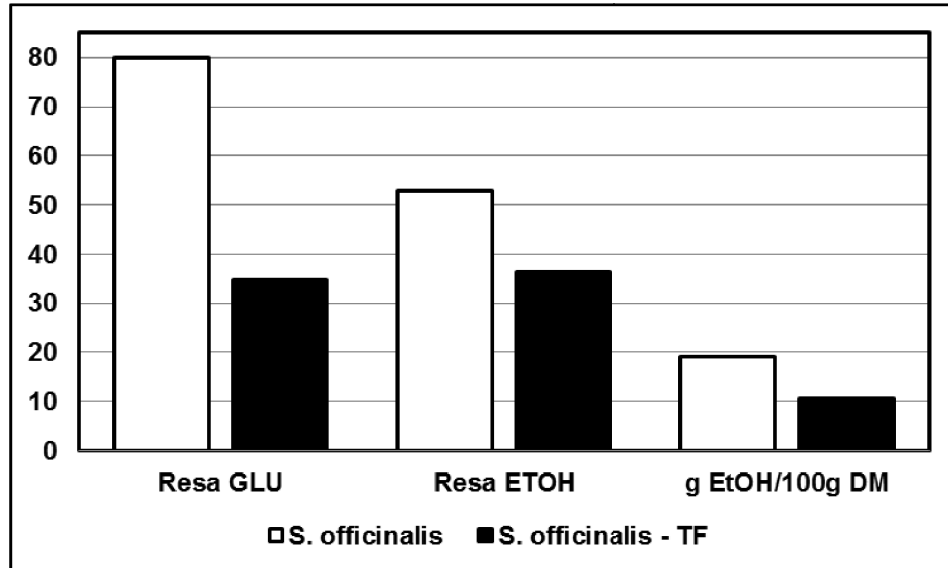


Figura 23. Confronto fra le rese raggiunte durante l'idrolisi e la fermentazione di glucosio ed etanolo per il *Symphytum* sfalciato a maturazione e quello tagliato di fresco.

4.3 PRETRATTAMENTO, IDROLISI E FERMENTAZIONE. PROVE IN FERMENTATORE

In base ai dati in termini di resa di glucosio, etanolo ed in base agli interessi in termini di produttività della biomassa ed efficienza di fitodepurazione, sono state scelte le prove in fermentatore le seguenti specie vegetali: *Miscanthus x giganteus*, *Arundo donax*, *Symphitum officinalis*, *Cyperus papyrus*, *Phragmites australis*, *Vetiveria zizanioides* e *Carex riparia* allo stadio di maturazione della pianta.

Analogamente a quanto fatto nelle prove condotte in beuta le biomasse sono state pretrattate così come descritto nella sezione 2.3.1.

I dati composizionali in termini di contenuto in fibre sono quelli mostrati precedentemente nelle tabelle 10 e 12

Al termine di ciascuno step di pretrattamento sono stati estratti dal liquido surnatante dei campioni su cui sono state quantificate le concentrazioni di glucosio e xilosio. I dati ottenuti sono riportati in tabella 21

Specie vegetale	Estratto acido		Estratto alcalino		Resa % Xi
	Xi (g/l)	GLU (g/l)	Xi (g/l)	GLU (g/l)	
<i>Arundo. donax</i>	5,20	0,10	0,50	-	26
<i>Carex riparia</i>	2,05	-	0,50	-	11
<i>Cyperus papyrus</i>	5,10	0,21	0,45	-	34
<i>Miscanthus x giganteus</i>	6,45	0,25	0,70	-	34
<i>Phragmites australis</i>	2,90	-	0,05	-	16
<i>Symphitum officinalis</i>	1,85	-	0,35	-	26
<i>Vetiveria zizanioides</i>	4,65	-	1,30	-	21

Tabella 21. Concentrazione di glucosio e xilosio nel liquido surnatante dopo ciascuno step di pretrattamento. Percentuale di xilosio recuperato espresso come percentuale della teorica.

Osservando la tabella precedente si nota come lo xilosio, derivante dall'idrolisi acida della emicellulosa, sia presente quasi esclusivamente nel liquido surnatante proveniente dallo step

acido ed in maniera minore nel liquido surnatante proveniente dallo step alcalino. Il glucosio invece è pressoché assente in entrambi i liquidi surnatanti con una presenza di glucosio in tracce per i liquidi surnatanti provenienti da *Arundo donax*, *Cyperus papyrus* e *Miscanthus x giganteus*.

La distribuzione degli zuccheri trovata nei liquidi surnatanti conferma l'ipotesi che il pretrattamento durante il primo step acido solubilizzi solo la parte di fibra emicellulosica che viene poi completata nello step alcalino successivo e lasciando pressoché invariata la parte di fibra cellulosa.

Nell'ultima colonna sono riportate le rese percentuali di produzione dello xilosio in seguito all'idrolisi acida dell'emicellulosa durante la prima fase del pretrattamento. Le percentuali si sono rivelate piuttosto basse, comprese tra l'11% della *Carex riparia* ed il 34% del *Miscanthus x giganteus* e del *Cyperus papyrus*, probabilmente a causa della temperatura piuttosto bassa durante questa fase. Ulteriori prove dovranno essere condotte per cercare di aumentare la concentrazione dello xilosio prodotto durante questa fase, in modo tale da poter utilizzare lo xilosio prodotto in fermentazioni dedicate o cercare di recuperare tale zucchero dal estratto del primo step del pretrattamento per esempio per cristallizzazione (Curreli *et al.*, 2002).

Le biomasse pretrattate della tabella 21 sono sottoposte ad idrolisi ed a successiva fermentazione usando un fermentatore da 1,5 l modello BBI BIostat B mediante un processo tipo SHF. Nelle figure 24÷30 sono riportati gli andamenti delle idrolisi delle specie considerate riportando in ascissa il tempo di prelievo ed in ordinata la concentrazione di glucosio raggiunta a quel tempo.

Le idrolisi seguono un andamento molto diverso tra loro. Per il *Symphitum officinalis* e per la *Phragmites australis* l'idrolisi raggiunge il massimo già alla ventiquattresima ora. Per le due specie può essere calcolata una velocità media di idrolisi nelle 24 ore pari rispettivamente a 0,97 e di 0,7 g/l*h⁻¹. Per la *Vetiveria zizanioides* e per la *Carex riparia* la velocità di idrolisi è massima nelle prime ventiquattro ore e pari rispettivamente a 1,0 e 1,4 g/l*h⁻¹. Nelle successive 24 ore l'idrolisi non si arresta ma la velocità di idrolisi è notevolmente ridotta passando rispettivamente ad un valore di 0,14 e 0,22 g/l*h⁻¹. Dopo 48 ore per entrambe le specie l'idrolisi può essere considerata conclusa.

Per la *Cyperus papyrus* e per l'*Arundo donax* si osserva invece un progressivo aumento della concentrazione del glucosio. Per il *Cyperus papyrus* l'aumento progressivo del glucosio dura 48 ore con una velocità di idrolisi che può essere calcolata in 0,38 g/l*h⁻¹. Alla quarantottesima ora l'idrolisi può essere considerata conclusa. Per l'*Arundo donax* la

concentrazione di glucosio aumenta costantemente per 72h con una velocità pari $0,30 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$. Dopo 72 ore l'idrolisi per *l'Arundo donax* può essere considerata conclusa.

Per il *Miscanthus x giganteus* invece l'idrolisi parte solo dopo 24 ore con una velocità pari a $0,52 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$.

Dopo le 48 ore la velocità di idrolisi scende a $0,09 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$ e dopo 72 ore può considerarsi conclusa.

In tabella 22 sono riportate le rese di glucosio ed etanolo espresse come percentuale della resa teorica, la resa della fermentazione e i grammi di etanolo ottenuti ogni 100g di sostanza secca iniziale.

SPECIE VEGETALE	Resa GLU	Resa EtOH	Resa Fermentazione	g(EtOH)/ 100g DM
<i>Arundo donax</i>	54,5	53,4	98	13,5
<i>Carex riparia</i>	86,4	82,3	83,7	28,9
<i>Cyperus papyrus</i>	77,6	58,4	95,3	20,5
<i>Miscanthus x giganteus</i>	38,4	38,6	105,5	10,7
<i>Phragmites australis</i>	54,5	54,1	99,3	16,4
<i>Symphythum officinalis</i>	43,6	45,3	103,8	15,6
<i>Vetiveria zizanooides</i>	73,3	72,4	98,7	16,2

Tabella 22. Le rese di glucosio ed etanolo sono espresse come percentuale della resa teorica e la resa della fermentazione ottenute durante le SHF in fermentatore.

Le migliori rese in termini di idrolisi e produzione di etanolo si hanno per la *Carex riparia* e la *Vetiveria zizanooides* mentre per il *Miscanthus* e *l'Arundo donax*, che hanno suscitato parecchio interesse durante l'attività di questo progetto per le loro proprietà in termini di produttività e capacità fitodepurativa, le rese in etanolo sono sotto i valori medi la letteratura.

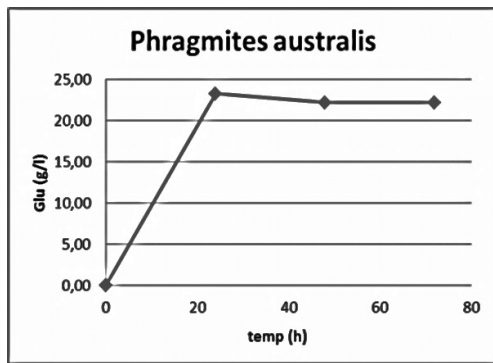


Figura 24. Andamento della concentrazione di glucosio durante l'idrolisi della *P. australis*.

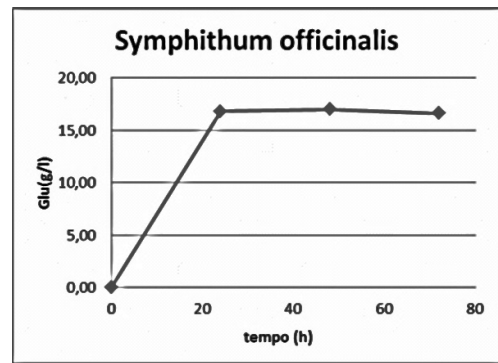


Figura 25. Andamento della concentrazione di glucosio durante l'idrolisi del *S. officinalis*.

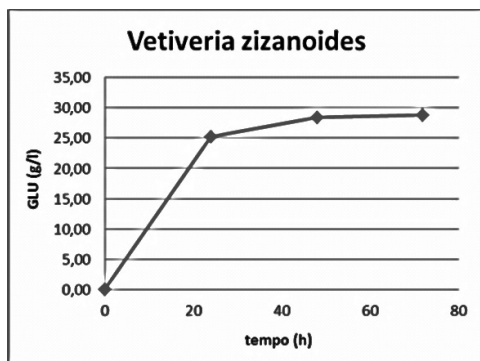


Figura 26. Andamento della concentrazione di glucosio durante l'idrolisi della *V. zizanioides*.

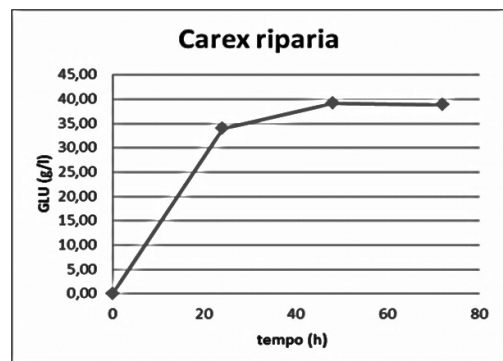


Figura 27. Andamento della concentrazione di glucosio durante l'idrolisi della *C. riparia*.

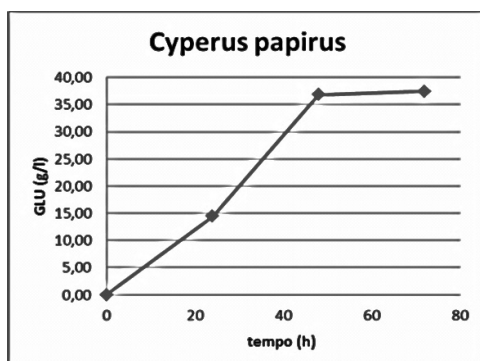


Figura 28. Andamento della concentrazione di glucosio durante l'idrolisi del *C. papyrus*.

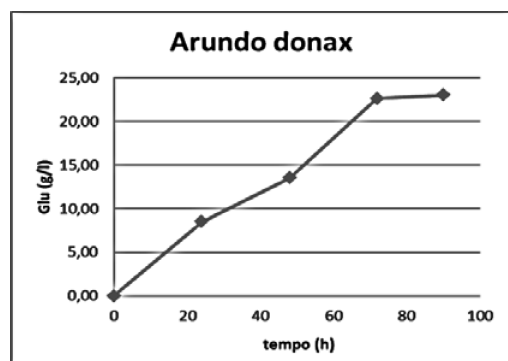


Figura 29. Andamento della concentrazione di glucosio durante l'idrolisi dell' *A. donax*.

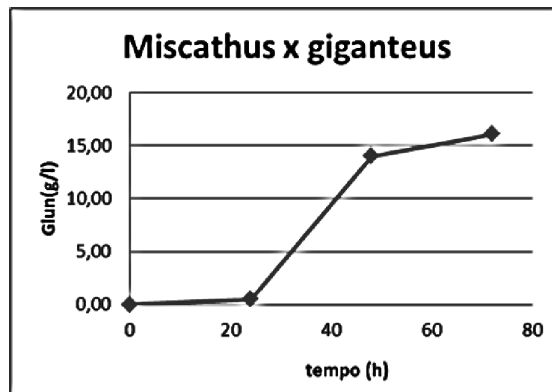


Figura 30. Andamento della concentrazione di glucosio durante l'idrolisi del M. x giganteus.

Mettiamo a confronto i valori ottenuti delle rese di glucosio ed etanolo espresse come percentuale della teorica e le rese della fermentazione ottenute con gli esperimenti in beuta con quelle ottenute durante gli esperimenti in fermentatore come mostrato nelle figure 31, 32 e 33. Generalmente le percentuali delle rese in glucosio sono più alte nelle esperienze ottenute in fermentatore rispetto a quelle ottenute in beute. Questo può essere attribuito al fatto che usando il fermentatore si ottiene un migliore mescolamento dei reagenti e della biomassa soprattutto all'inizio della fase di idrolisi quando la biomassa non è ancora liquefatta dagli enzimi. La migliore reologia che c'è quindi all'interno del fermentatore sicuramente rende meno importanti quei fenomeni che possono, in certo qual modo, inibire l'idrolisi come la stratificazione degli enzimi o l'adsorbimento permanente sulla superficie della biomassa.

Non solo migliora l'idrolisi usando il fermentatore ma anche la fermentazione stessa.

Durante le esperienze si è osservato che, con il procedere della fermentazione, il pH della beuta si acidificava notevolmente nonostante l'ambiente tamponato. Il pH alla fine della fermentazione era tanto più basso quanto più la resa in etanolo era alta. Con il procedere della fermentazione infatti si ha un accumulo dei prodotti di reazione come anidride carbonica ed acido acetico che abbassano il pH ed inibiscono l'azione dei lieviti (Viola *et al.*, 2004). I fermentatori invece sono dotati di un sistema di controllo automatico del pH che, mediante l'aggiunta controllata di soda e/o acido solforico, permettono di condurre la fermentazione al pH ideale durante tutto il proprio corso e pertanto ridurre gli effetti negativi dovuti alla diminuzione del pH durante la fermentazione.

Quindi le migliori rese di idrolisi, unite a migliori rese di fermentazione, hanno permesso di ottenere migliori rese di etanolo alla fine delle 24 ore di fermentazione.

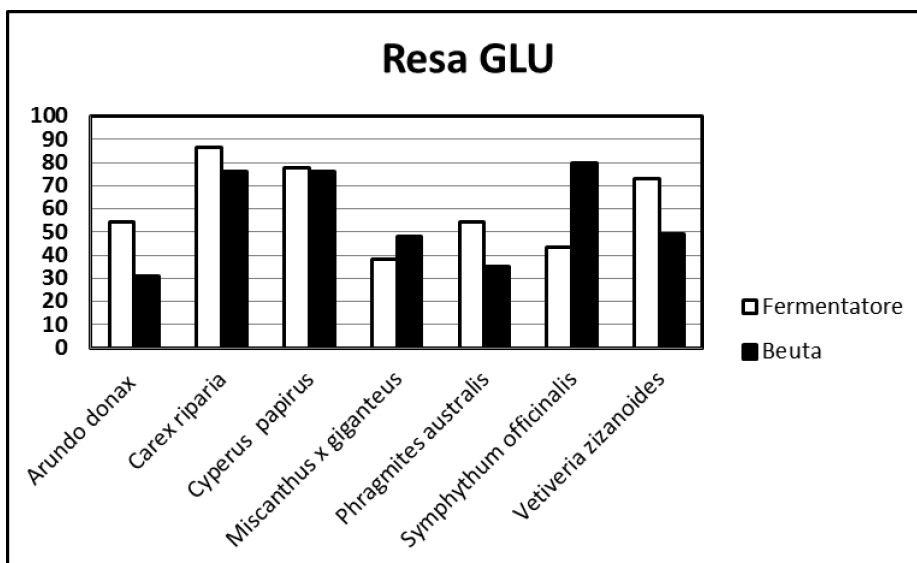


Figura 31. Rese del glucosio al termine delle idrolisi condotte in beuta ed in fermentatore espresse come percentuale della teorica.

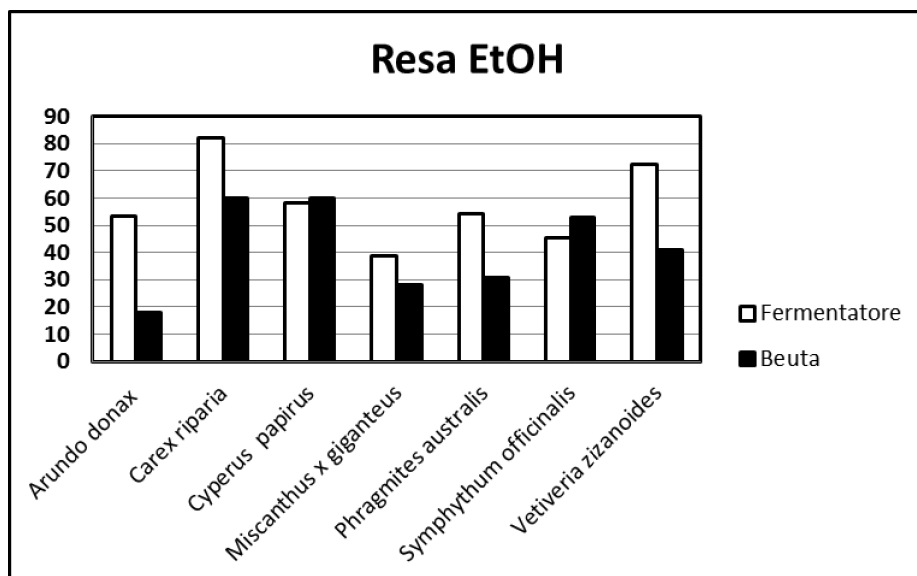


Figura 32. Rese dell'etanolo al termine delle fermentazioni condotte in beuta ed in fermentatore espresse come percentuale della teorica.

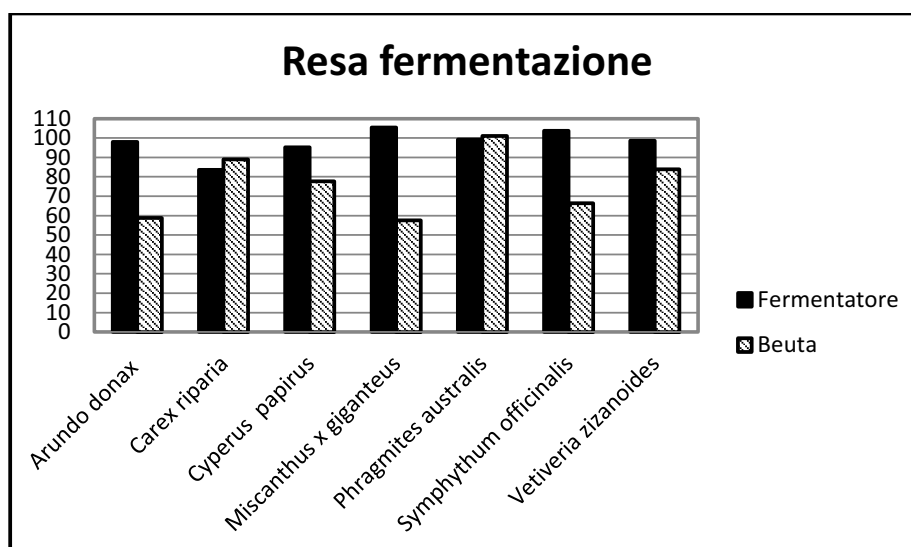


Figura 33. Rese dell'etanolo al termine delle fermentazioni condotte in beuta ed in fermentatore espresse come percentuale della teorica.

Per poter migliorare le rese in etanolo di due delle specie più promettenti dal punto di vista fitodepurativo ovvero *l'Arundo donax* ed il *M. x giganteus* si è proceduto ad eseguire con queste specie delle prove sperimentali mediante la tecnica SSF.

Le fermentazioni sono state seguite prelevando un campione ogni 24 ore durante tutto il loro corso e determinando il contenuto di glucosio ed etanolo sui campioni prelevati.

In figura 34 ed in figura 35 sono riportati gli andamenti di glucosio ed etanolo durante il corso della fermentazione.

Per il *Miscanthus x giganteus* si osserva un veloce aumento della concentrazione di etanolo nelle prime 24 ore con una velocità di $0,48 \text{ g/l} \cdot \text{h}^{-1}$. Successivamente l'etanolo continua ad aumentare anche se in maniera decisamente minore ed alle 96 ore la fermentazione è conclusa.

Come atteso nelle fermentazioni di tipo SSF, durante la fermentazione il livello di glucosio è prossimo allo zero poiché è consumato dai lieviti non appena è prodotto durante l'idrolisi.

Nel caso dell'*Arundo donax* si ha un lento aumento della concentrazione di etanolo durante la fermentazione con una velocità di media di $0,16 \text{ g/l} \cdot \text{h}^{-1}$. Dopo 96 la fermentazione ore può considerarsi conclusa.

Anche in questo, dopo un iniziale accumulo, il livello di glucosio durante la fermentazione SSF è prossimo allo zero.

Alla massima concentrazione di etanolo ottenuta per il *Miscanthus x giganteus* è calcolata una resa di produzione di etanolo espressa come percentuale della teorica pari al 63,2% mentre per l'*Arundo donax* la resa corrisponde al 74,2%.

Eseguendo le fermentazioni mediante SSF si sono avute le rese di etanolo più alte sia per il *Miscanthus x giganteus* che per l'*Arundo donax*, confermando lo schema SSF come il migliore possibile per condurre una fermentazione con biomassa lignocellulosica.

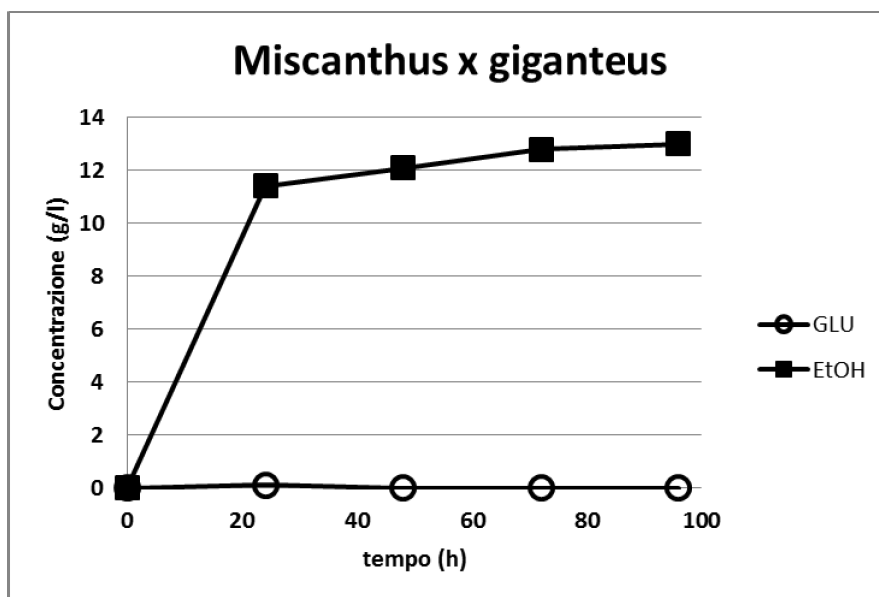


Figura 34. Variazione della concentrazione di glucosio ed etanolo durante l' SSF del *Miscanthus x giganteus*.

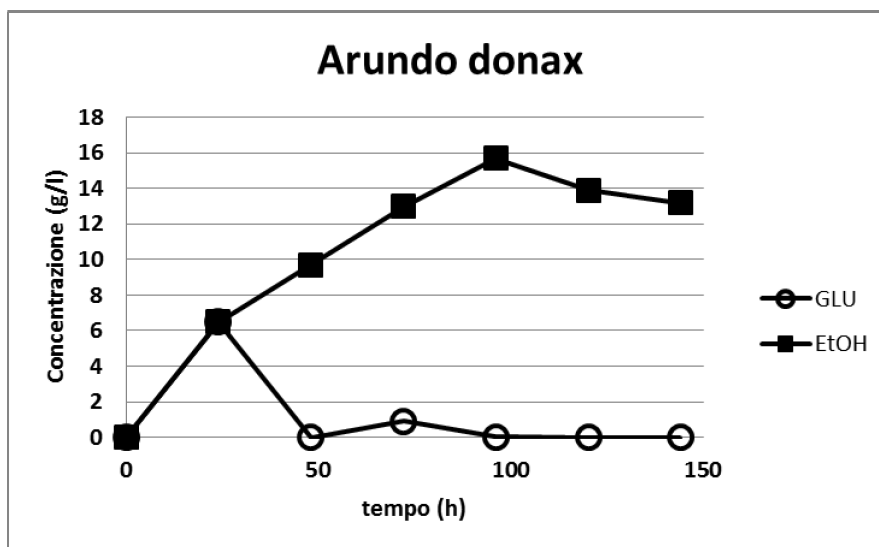


Figura 36. Variazione della concentrazione di glucosio ed etanolo durante l' SSF dell' *Arundo donax*

5. CONCLUSIONI

L'obiettivo specifico dell'attività svolta dall'U.O. ENEA-BAS è stato quello di testare la capacità di un gran numero di specie vegetali utilizzate nelle attività di fitodepurazione, alla produzione di etanolo di seconda generazione.

La produzione di bioetanolo prevede essenzialmente tre fasi: il pretrattamento della biomassa, l'idrolisi della biomassa pretrattata e la fermentazione degli idrolizzati.

Il pretrattamento è una fase necessaria poiché rende accessibile agli enzimi la frazione cellulosa della biomassa permettendo in tal modo la fase di idrolisi. Quindi nella logica del processo di produzione di etanolo di seconda generazione deve essere presente una efficace fase di pretrattamento della biomassa.

Uno dei principali obiettivi di questo lavoro è stato quello di sperimentare un pretrattamento chimico in condizioni di *mild* in grado di garantire una efficace idrolisi.

Per condizioni *mild* si intende sia basse concentrazioni dei reagenti utilizzati, in maniera tale da garantire al processo un basso impatto ambientale, e sia l'utilizzo di basse temperature in maniera tale da ridurre al minimo la spesa energetica per la produzione di etanolo che alla fine ovviamente deve avere un bilancio positivo in tal senso.

Il pretrattamento sperimentato ha previsto tre fasi allo scopo di ottenere un substrato che fosse più concentrato in termini di contenuto di cellulosa rispetto alla biomassa di partenza e pressoché privo di emicellulosa e soprattutto lignina. Nella prima fase la biomassa è stata trattata con acido solforico alla concentrazione del 2% alla temperatura di 80°C per 24 ore; in seguito la biomassa proveniente dal primo step è stata trattata con NaOH all'1% a 40°C per 24 ore. Al termine di questa fase la temperatura è stata portata a 25°C ed è stata aggiunta della acqua ossigenata concentrata fino alla concentrazione dell'1%.

Il pretrattamento è stato testato in una prima fase di screening su 23 specie vegetali differenti, fornite dalle unità operative DAFNAE-UNIPD e CSEI-CT, e si è rivelato particolarmente efficace in termini di solubilizzazione della emicellulosa e della lignina nonché di recupero della cellulosa. In media infatti la percentuale di emicellulosa solubilizzata è stata del 92%, la cellulosa recuperata è stata di quasi l'80% mentre la lignina solubilizzata è stata in media del 74%.

I risultati ottenuti in tal senso soddisfano gli obiettivi previsti dalle attività del progetto.

Infatti il residuo prodotto alla fine del pretrattamento è costituito quasi esclusivamente da cellulosa la cui composizione media delle fibre è dal 7% di emicellulosa, dall' 82% di cellulosa e dal 7% di lignina.

Il ricco substrato in cellulosa è stato quindi idrolizzato con una miscela di enzimi commerciali tra i più utilizzati allo scopo, ovvero il Celluclast 1.5L ed il Novozyme 188 al fine di fornire il giusto mix tra endoglucanasi, exoglucanasi e β -glucosidasi. Alla fine dell' idrolisi le beute sono state inoculate con il ceppo M861/10a di *Saccharomyces cerevisiae*.

E' stato verificato che le rese di glucosio ottenute ed espresse come percentuale della resa teorica sono state trovate essere dipendenti dal tipo di specie vegetale ed in particolare dal contenuto di lignina. In particolare, maggiore è il contenuto di lignina minore è la resa in glucosio. Ulteriori approfondimenti sono necessari per stabilire il legame tra resa in glucosio e altre grandezze come il grado cristallino della cellulosa ed il suo grado di polimerizzazione.

Le specie vegetali che hanno prodotto le migliori rese in etanolo sono state la *Carex riparia* e la *Glyceria maxima*.

In questa fase di screening iniziale, le attività pianificate inizialmente nel progetto prevedevano la sperimentazione, dalle analisi alla fermentazione, solamente su una decina di specie come per esempio *Arundo donax*, *Typha latifolia*, *Miscanthus giganteus*, *Glyceria maxima*, *Canna indica*., *Phalaris arundinacea* ed il *Symphytum officinalis*, con le quali si sarebbero dovuti provare diversi enzimi e/o diversi dosaggi enzimatici. Durante il corso del progetto però è cresciuto l'interesse verso altre specie vegetali poco utilizzate sia nel campo fitodepurativo sia per la produzione di bioetanolo. Pertanto il numero delle specie vegetali considerate è salito a più del doppio rispetto a quello inizialmente previsto di circa 10 specie arrivando ad un totale di 23 specie. L'interesse sperimentale si è così spostato dall'effetto di più mix di enzimi su poche piante a quello di un solo mix di enzimi particolarmente, utilizzato allo scopo della produzione di etanolo (Celluclast 1.5L e Novozyme 188) usando delle condizioni sperimentali standard.

Al termine di questa fase, sono state eseguite prove di pretrattamento, idrolisi e fermentazione di tipo SHF, usando dei fermentatori su scala banco del volume di 2/5 litri su quelle specie che hanno dato le migliori rese in termini di produttività vegetale, efficacia fitodepurativa e produzione di etanolo ovvero *Arundo donax*, *Carex riparia*, *Cyperus papyrus*, *Miscanthus x giganteus*, *Phragmites australis*, *Symphytum officinalis*, *Vetiveria zizanioides*.

Per questa specie si è potuto osservare un miglioramento delle rese di glucosio ed etanolo attribuito alla migliore reologia che si ha all'interno del fermentatore rispetto alla beuta, nonché ad un più efficace controllo del pH durante il corso della fermentazione.

Infine, per cercare di ottenere rese più alte in etanolo da due delle più interessanti specie dal punto di vista della produttività della biomassa, ovvero il *Miscanthus x giganteus* e l' *Arundo donax*, si è proceduto ad eseguire delle prove di fermentazione di tipo SSF. Con questo tipo di fermentazione sono state ottenute rese più alte in etanolo sia rispetto alle fermentazioni in beuta sia rispetto alle fermentazioni condotte in fermentatore di tipo SHF, confermando il dato che per i materiali lignocellulosici è preferibile condurre una fermentazione di tipo SSF rispetto ad una di tipo SHF (Ask M. *et al.*, 2012). Per l' *Arundo donax* è stato raggiunto un valore di resa di etanolo pari al 74,2% della resa teorica che rappresenta un valore non lontano da quelli ottenuti con steam explosion compresi tra l'80 ed il 78% (Bura *et al.*, 2012).

Il lavoro svolto apre a molti approfondimenti futuri. Molte problematiche venute alla luce durante questo studio potranno essere approfondite: verificare l'influenza del pretrattamento sul grado cristallino e sul grado di polimerizzazione della cellulosa e di conseguenza l'effetto di questi parametri sulla idrolisi enzimatica; migliorare le rese di recupero dello xilosio prodotto durante lo step del pretrattamento acido in modo tale da poterlo recuperare per cristallizzazione come sottoprodotto dal valore aggiunto; massimizzare la resa di etanolo finale su quelle specie che hanno mostrato la miglior attitudine alla produzione di etanolo come l' *Arundo donax* partendo da concentrazioni più alte di biomassa durante l'idrolisi, usando dosaggi e/o enzimi differenti.

6. BIBLIOGRAFIA

Alvira P., Tomàs-Pejò M., Ballesteros M., Negro M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.* 101, pp. 4851-4861.

Ask M., Olofsson K., Di Felice T., Ruohonend L., Penttilä M., Lidén G. 2012 Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry* 47, pp. 1452–1459

Bauer N.A., Gibbons W.R. 2012. Saccharification versus simultaneous saccharification and fermentation of kraft pulp. *Int J Agric & Biol Eng*, 5(1), pp 48-55.

Bhat M.K., Bhat S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial application. *Biothechnol. Adv*15, pp 583-620

Brown R.M., Saxena I.M., 2000. Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant. Physiol. Biochem.* 38, pp. 57-67

Bura R., Ewanick S., Gustafson R. 2012. Assessment of *Arundo Donax* (Giant reed) as feedstock for conversion to ethanol. *Tappi Journal* 11 (4) pp. 59-66

Burner D.M., Tew T.L., Harvey J.J., Belesky D.P. 2009. Dry matter partitioning and quality of *Mischanthus*, *Panicum* and *Saccharum* genotypes in Arkansas, USA. *Biomass and Bioenergy* 33, pp. 610-619

Carvalho F., Duarte L.C., Girio F.M., 2008. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. *J. Sci. Ind. Res.* 67, pp. 849-864

Chandra R.P., Bura R., Mabee, W.E., Berlin A., Pan X., Saddler J.N. 2007. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosic? *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108, pp. 67-93

Cherry J.R., Fidantsef A.L., 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, pp. 438-443

Crowford R.L., 1981. Lignin biodegradation and transformation. New York, J. Wiley and sons. ISBN 0-471-05743-6

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

De Bari I., Dininno G., Braccio G. 2008. Bioetanolo da residui della lavorazione del mais. Process design e analisi del ciclo di vita. Rapporto tecnico ENEA RT/2008/41/TER, ISSN 0393-3016

Demain A.L., Newcomb M., Wu D.J.H., 2005. Cellulase, clostridia and ethanol microbiology. *Mol. Biol. Rev.* 69, pp. 124-154

Fan L.T., Gharpuray M.M., Lee Y.H., 1987. Cellulose Hydrolysis, Springer edition

Fiorese G., Gatto M., Guariso G., 2006. Tecnologie e prospettive della produzione di energie da biomasse. Corso di aggiornamento del Politecnico di Milano

Fox J.M., Levine S.E., Blanch H.W., Clark D.S., 2012. An evaluation of cellulose saccharification and fermentation with an engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of cellobiose and xylose utilization. *Biotechnol J* 7(3), pp. 361-373

Fromm J., Rockel B., Lautner S., Winseisen E., Wanner G., 2003. Lignin distribution in wood cell walls determined by TEM and backscattered SEM technologies. *J. Structural Biol.* 143, pp. 77-84

Galbe M., Zacchi G., 2002. A Review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol Biothechnol* 59, pp. 618-619

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

Grohmann K., 1993. Simultaneous saccharification and fermentationof cellulosic substrates to ethanol. Saddler JN (ed) *Bioconversion of forest and agricultural plant residues*. CAB, Wallingford, UK, pp. 183–209

Ha S., Galazkac J.M., ,Kima S., Choi J. Yang X., Seo J., Glass N.L., Cate J.H.D. , Jin Y. 2010. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Applied Biological Sciences*, 108 (2) pp. 504-509.

- Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, vol. 100 (1) pp. 10–18
- Holtzapple M., Cognata M., Shu Y., Hendrickson C. .1990. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol Bioeng* 36, pp275–287
- Hu Z., Wang Y., Wen Z., 2008. Alkali (NaOH) pretreatment of switchgrass by radio frequency-based dielectric heating. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 148, pp. 71–81
- Isci A., Murphy P.T., Anex R.P., Moore K.J. 2008. A rapid Simultaneous Saccharification and Fermentatio (SSF) technique to determine ethanol yields. *Bioener, Res.* 1, pp. 163-169.
- Kapdan L.K., Kargi F., 2006. Biohydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* 38, pp. 92-97
- Kumar R., Singh S., Singh O.V., 2008, Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, pp. 377-391.
- Kumar R., Wyaman C.E. 2009. Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology? *Bioresour Thecnol.* 100, pp. 4193-4202.
- Le Ngoc Huyen T., Rémond C., Dheilly R.M., Chabbert B., 2010. Effect on harvesting date on the composition and saccharification of *Mischanthus x giganteus*. *Bioresource Technology* 101, pp.8224-8231.
- Liang Y., Siddaramu T., Yesuf J., Sarkany N. 2010. Fermentable sugar release from *Jatropha* seed cakes following lime pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* 101(16), pp. 6417–6424
- Ligero E.L., Ravagnani T.M.K. 2003. Dehydration of ethanol with salt effective distillation – a comparative analysis between processes with salt recovery, *Chemical Engineering and Processing*, 42, pp. 543-552
- Lynd L.R., Weimer P.J., Vanzyl W.H., Pretorius I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology and microbiology. *Mol. Biol. Rev.* 66, pp. 506-577
- MacDonald D. G., Bakhshi N, Mathews J. F., Roychowdhury A., Bajpai P., Moo-Young M., 1983. Alkaline treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 25(8), pp. 2067–2076

- Mandels M., Reese E.T., ,1963. Inhibition of cellulases and β -glucosidases. In: Reese ET (ed) *Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials*. Pergamon, London, pp 115–157
- Mansfield S.D., Mooney C., Saddler J.N. 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biohectnol. Prog.* 15, 804-816
- Martin C., Klinke H.B., Thomsen A.B. 2007. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology* 40, pp. 426-432.
- Monsier, N., Handrickson R. Ho N. Sedlak N., Ladish M.R. 2005b. Optimisation of pH controlled liquid ot water pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96, 673-686.
- Monsier, N., Wyman C.E., Dale B.D., Elander R.T., Lee Y.Y., Holtzaplle M., Ladisch C.M., 2005a. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, pp 673-686
- Murphy J. D., Mc Carthy K., 2005. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Applied Energy* 18 (2), pp. 148-166
- Niehaus F., Bertolo C., Kahler M., Antrakian G., 1999. Extremophilies as a soure of novel enzyme for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, pp. 711-729
- Paoli L., 2001. *Energie rinnovabili. Impieghi su piccola scala*. Ed. Il Rostro
- Park Y., Shiroma R., Al-Haq M. I. *et al.* 2010. A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw—calcium capturing by carbonation (CaCCO) process. *Bioresource Technology*, vol. 101 (17) pp. 6805–6811
- Pinto R.T.P., Wolf-Maciel M.R., Lintomen L. 2000. Saline extractive distillation process for ethanol purification, *Computers and Chemical Engineering*, 24, pp. 1689-1694
- Rabinovich M.L., Melnik M.S., Bolobova A.V., 2002. Microbial cellulose: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, pp. 305-321
- Romanowska I., Polak J., Bielecki S. 2006. Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT 90 for bakery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, pp. 665-671
- Saddler J.N., Gregg D.J.1998. Ethanol production from forest product wastes. In: Bruce A, Palfreyman JW (eds) *Forest products biotechnology*. Taylor & Francis, London, pp 183–207

Saha B.C., 2000. Alpha L-Arabinofuranosidase biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol Adv.* 18, pp. 403-423

Saha B.C., Iten L.B., Cotta M.A., Wu Y.V. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw. *Process. Biochem.* 40, pp. 3693-3700

Saratale G.D., Oh S.E., 2012. Lignocellulosics to ethanol: The future of the chemical and energy industry. *African Journal of Biotechnology* Vol 11(5), pp. 1002-1013

Smith B.T., Knutsen J.S., Davis R. H., 2010. Empirical evaluation of inhibitory product, substrate enzyme effects during the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Appl. Biochem Biothechnol* 161, pp. 468-482

Soto M. L., Dominguez H., Nunez M. J, .Lema J. M., 1994. Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower rhulls. *Bioresource Technology* 49 (1), pp. 53–59

Sternberg D., Vijayakumar P., Reese E.T. .1977. β -Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can J Microbiol* 23, pp. 139–147

Sun Y., Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Thecnol.* 83, pp. 1-11

Tengborg C., Galbe M., Zacchi G. 2001. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Biotechnol Prog* 17, pp. 110–117

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

Vane L. M., Namboodiri V. V., Bowen T. C. 2008. Hydrophobic zeolite silicone rubber mixed matrix membranes for ethanol–water separation: Effect of zeolite and silicone component selection on pervaporation performance. *Journal of Membrane Science* 308, pp. 230-241

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

Wyman C.E. 2007. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends biotechnol.* 25 (4), pp. 153-157

Yang B., Wyman C.E., 2008. Pretreatment: the key to unlocking low cost lignocellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 2, 26-40

Yoshida M., Liu Y., Uchida S., Kavarada K., Ukagami Y., Ichinose H., Keneko S., Fokuda K. 2008. Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose and lignin on the enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to monosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72 (3), pp. 805-810

Zhang H.Y., Lynd L.R., Toward an aggregate understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 779-797

Zhang P.Y.H., Himmel M.E., Mielenz J.R., 2006. Outlook for cellulose improvement. Screening and selection strategies. *Biothechnol. Adv.* 24, pp. 452-481

Zhao Y., Wang Y., Zhu J. Y., Ragauskas A., Deng Y. 2008. Enhanced enzymatic hydrolysis of spruce by alkaline pretreatment at low temperature. *Biotechnology and Bioengineering* . 99 (6), pp. 1320–1328

Zhu J., Wan C., Li Y., 2010. Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment. *Bioresource Technology* 101 (19), pp. 7523–7528

Edito dall' **ENEA**
Servizio Comunicazione

Lungotevere Thaon di Revel, 76 - 00196 Roma

www.enea.it

Stampa: Tecnografico ENEA - CR Frascati

Pervenuto il 19.3.2013

Finito di stampare nel mese di maggio 2013