

FRANCESCO ZIMBARDI

Dipartimento Tecnologie Energetiche
Unità Supporto Tecnico-Strategico
Centro Ricerche Trisaia, Rotondella (Matera)

**G. ARCIERI, E. VIOLA, N. CERONE, U. DE CORATO
V. VALERIO, M. CARNEVALE**

Dipartimento Tecnologie Energetiche
Divisione Bioenergia, Bioraffineria e Chimica Verde
Centro Ricerche Trisaia, Rotondella (Matera)

CONDIZIONAMENTO DI MATERIALE LIGNOCELLULOSICO PER LA PRODUZIONE DI ETANOLO DI SECONDA GENERAZIONE

RT/2016/5/ENEA



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

FRANCESCO ZIMBARDI
Dipartimento Tecnologie Energetiche
Unità Supporto Tecnico-Strategico
Centro Ricerche Trisaia, Rotondella (Matera)

G. ARCIERI, E. VIOLA, N. CERONE
U. DE CORATO V. VALERIO, M. CARNEVALE
Dipartimento Tecnologie Energetiche
Divisione Bioenergia, Bioraffineria e Chimica Verde
Centro Ricerche Trisaia, Rotondella (Matera)

CONDIZIONAMENTO DI MATERIALE LIGNOCELLULOSICO PER LA PRODUZIONE DI ETANOLO DI SECONDA GENERAZIONE

RT/2016/5/ENEA



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

I rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina <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.

CONDIZIONAMENTO DI SUBSTRATI LIGNOCELLULOSICI PER LA PRODUZIONE DI ETANOLO DI SECONDA GENERAZIONE

F. Zimbardi, G. Arcieri, E. Viola, N. Cerone, U. De Corato, V. Valerio M. Carnevale

Riassunto

L'impiego di biomasse residuali per ottenere bioenergia e *green chemicals* è una concreta possibilità di contribuire allo sviluppo sostenibile. Questi materiali sono composti principalmente da polimeri di carbonio (cellulosa, emicellulosa) e polimeri fenolici (lignina) e hanno grandi potenzialità di utilizzo. Le biomasse lignocellulosiche opportunamente condizionate, sono utilizzate come substrato di fermentazione e riserva di sostanze aromatiche per produrre biocombustibili o monomeri di base. Una fase fondamentale di questa trasformazione è la separazione dei tre macrocostituenti, uno stadio chiamato pretrattamento che può essere realizzato in modalità anche molto varie. Di particolare interesse è l'utilizzo di vapore saturo a ca 200°C, che è efficace, economico e con un basso impatto ambientale. Un effetto collaterale dei pretrattamenti idrotermici è la produzione di molecole indesiderate, derivanti dalla disidratazione di alcuni zuccheri, che possono inficiare i successivi stadi. Il successo dell'intera filiera dipende dall'ottimizzazione di questi primi stadi della *bioraffinazione* che, infatti, è stato l'obiettivo di uno dei più impegnativi progetti del programma del Ministero dello Sviluppo Economico *Industria 2015*, il PR.IT. (*Sviluppo di una tecnologia di PRetrattamento ITALIANA per la produzione di bioetanolo di seconda generazione*) in cui è stata largamente coinvolta l'ENEA.

Nelle attività di cui si riporta, gli autori hanno sperimentato l'impiego di un essiccatore a pale cave, interposto a valle del pretrattamento di *steam explosion* di paglia di grano e a monte dei successivi processi di idrolisi e fermentazione. L'essiccatore è stato impiegato con successo per la rimozione di alcuni inibitori della fermentazione alcolica e per migliorare l'idrolisi enzimatica ad alta concentrazione iniziale di solido sia in termini di resa che di fluidificazione.

L'essiccatore è stato utilizzato in diverse configurazioni. I migliori risultati di detossificazione sono stati ottenuti con trattamenti di un'ora a 65 °C, con l'ausilio di uno spray addizionale di acqua. In questo modo la concentrazione iniziale di acido acetico e furfurale nel substrato (2,4% e 0.26% in peso rispettivamente) si sono ridotte di circa un ordine di grandezza. Prove d'idrolisi e fermentazione hanno dimostrato incrementi di resa d'idrolisi (da 47-70% nell'esplosivo tal quale a 70-93% nell'esplosivo detossificato) e produzioni alcoliche con rese del 96% rispetto ai potenziali stechiometrici. Una configurazione innovativa sperimentata nell'ambito del progetto è consistita nell'utilizzo del sistema di essiccazione a pale cave come reattore di idrolisi per elevati rapporti solido/liquido. Le idrolisi enzimatiche effettuate in questa configurazione con un carico di solido del 40% in peso hanno avuto un aumento di resa del 51% rispetto ai sistemi tradizionali da banco.

Inoltre, la fluidità dello *slurry* era sufficiente da potere essere pompato e immesso nelle normali linee d'impianto già nella prima ora di idrolisi, una prestazione di particolare rilievo per la scalabilità industriale del processo.

Parole chiave: pale cave, bioetanolo, pretrattamento, idrolisi enzimatica, detossificazione

Abstract

The use of residual biomass for bio-energy and green chemicals is a real opportunity to contribute to the sustainable development. These materials are mainly composed polycarbohydrates (cellulose, hemicellulose) and phenolic polymers (lignin) and have huge potential for practical use. The lignocellulosic biomass, after a suitably conditioning, is used as substrates for fermentation and source of aromatics to produce biofuels or chemical building blocks. Subsequent processes of separation, purification and chemical synthesis may be used to access an extremely wide range of products. A key step of this transformation is the separation of the three macronutrients, a stage called pretreatment that can be realized in very different ways. Of particular interest is the use of saturated steam, at about 200 °C, which is efficient, inexpensive and with low environmental burden. A side effect of the hydrothermal pretreatment is the production of byproducts, arising from the dehydration of sugars, which may affect the subsequent stages.

In this work the authors pioneered the use of a paddle dryer, downstream of the pretreatment of straw by steam explosion and upstream of the subsequent processes of hydrolysis and fermentation. The air drying was employed for the removal of inhibitors of alcoholic fermentation, such as acetic acid and furfural, and to improve the enzymatic hydrolysis at high initial concentration of solid.

The dryer was used in different configurations. The best results were obtained with the detoxification treatment of one hour at 65 °C, with the simultaneous spraying of water on the biomass. In this way the initial concentration of acetic acid and furfural in the substrate (2.4% and 00:26% by weight, respectively) was reduced by an order of magnitude.

Hydrolysis tests showed an increase of hydrolysis yield from 47-70% to 70-93% respectively in the raw exploded and the exploded detoxified.

While the not-detoxified exploded straw did not produced ethanol after hydrolysis, the conditioned exploded gave an ethanol yield of 96%,

The drying system was used as hydrolysis reactor for very high ratios solid / liquid. The yield of enzymatic hydrolysis in this configurations, with a load of solid of 40% by weight, increased by 51% compared to traditional bioreactors. Additionally, the fluidity of the slurry was sufficient to be pumped in normal lines plant, the provision of particular importance to the scalability of the industrial process.

Key words: paddle dryer, bioethanol, pretreatment, enzymatic hydrolysis, detoxification

INDICE

1. RIASSUNTO	3
2. ABSTRACT	4
3. INTRODUZIONE	7
3.1 IL PROGETTO PRIT	7
3.1.1 Obiettivi del progetto PRIT.....	8
3.2 GENERALITÀ.....	9
3.3 IL PRETRATTAEMNTO DI STEAM EXPLOSION	11
3.4 METODI DI DETOSSIFICAZIONE	11
3.5 L'ESSICCATORE CON APPARECCHIATURA PALE CAVE.....	13
4. METODOLOGIA SPERIMENTALE	15
4.1 MATERIALI	15
4.2 PREPARAZIONE DELLA BIOMASSA ESPLOSA.....	15
4.3 USO DELL'ESSICCATORE A PALE CAVE PER LA DETOSSIFICAZIONE DELL'ESPLOSO	15
4.4 IDROLISI ENZIMATICA E FERMENTAZIONE	19
4.5 CARATTERIZZAZIONE E ANALISI CHIMICHE	19
6. RISULTATI E DISCUSSIONE	21
6.1 PREPARAZIONE ED ANALISI DEI SUBSTRATI.....	21
6.2 ANALISI DEGLI INIBITORI.....	23
6.3 PROVE DI IDROLISI ENZIMATICA E FERMENTAZIONE.....	26
6.4 PROVE DI IDROLISI ENZIMATICA CONDOTTE NEL SISTEMA A PALE CAVE	32
7. CONCLUSIONI	38
8. RINGRAZIAMENTI	38
9. BIBLIOGRAFIA	39

4. INTRODUZIONE

4.1 IL PROGETTO PRIT “SVILUPPO DI UNA TECNOLOGIA DI PRETRATTAMENTO ITALIANA PER LA PRODUZIONE DI BIOETANOLO DI SECONDA GENERAZIONE”








L'interesse industriale a utilizzare le biomasse per prodotti di largo consumo ottenuti correntemente dalla petrolchimica è stato alquanto alterno negli ultimi decenni.

Alle considerazioni economiche si sono aggiunti i vincoli di sostenibilità introdotti sempre più autorevolmente per contrastare l'effetto serra e l'inquinamento ambientale. È ragionevole prevedere che lo sviluppo della *bioeconomy* nei prossimi anni sarà meno vincolato alla quotazione del barile di petrolio e che per i soggetti industriali sarà possibile pianificare investimenti a medio e lungo termine contando anche su incentivi economici.

Inoltre, il quadro normativo è sempre più definito e favorevole alle innovazioni di processo e di prodotto conseguibili con l'approccio della *green chemistry*.

La politica di decarbonizzazione del sistema energetico e delle merci è fortemente sostenuta dalla Comunità Europea ed è stata recepita a livello Nazionale con l'adozione di specifiche misure nei programmi di sviluppo industriale. In particolare, il programma *Industria 2015* messo a punto dal Ministero dello Sviluppo Economico ha previsto misure di sostegno alle industrie impegnate a conseguire obiettivi di avanzamento tecnologico in nuovi processi e prodotti per biocombustibili di seconda e terza generazione, anche con utilizzo di materiali di scarto. Intorno a tale tema si sono raccolti gli interessi di diversi soggetti industriali e dei più importanti enti di ricerca che collaboravano da tempo, anche se in un contesto poco organico.

L'ENEA ha contribuito a focalizzare gli interessi dei partner sulla tecnologia di frazionamento della biomassa e sulla successiva trasformazione per via biologica o chimica dei carboidrati e della lignina. Quest'azione è stata possibile grazie all'esperienza maturata nel settore dall'Agenzia in oltre due decenni e alla solida posizione in ambito internazionale nella ricerca riguardante la bioenergia e i biomateriali. In risposta ad un bando del suddetto programma si è costituito un consorzio per la realizzazione del primo impianto produttivo al mondo di etanolo di seconda generazione, i partecipanti sono stati:

-  *Chemtex Italia srl*
-  *Engico Services srl*
-  *ENEA*
-  *CNR*
-  *Novamont*
-  *Università di Firenze-CREAR*
-  *Università di Torino*

La partnership, costituita da 3 industrie e 4 organismi di ricerca, si è impegnata in un rilevante sforzo anche di tipo economico.

Il progetto denominato “Sviluppo di una tecnologia di PREtrattamento ITaliana per la produzione di bioetanolo di seconda generazione” con acronimo PRIT, ha condotto allo sviluppo di una tecnologia italiana in grado di pretrattare differenti materiali lignocellulosici riducendo la formazione di sostanze che possono agire da inibitori nei successivi step del processo di produzione di bioetanolo di seconda generazione.

4.1.1 Obiettivi del progetto PRIT

L'obiettivo generale del progetto è stato la costruzione di un impianto dimostrativo di pretrattamento di biomassa lignocellulosica, che alimentasse un impianto per la produzione di 40.000 ton/anno di bioetanolo. L'impianto è stato realizzato ed esercito a Vercellino Piemontese essendo ora parte di una installazione industriale del gruppo Mossi&Ghisolfi a cui faceva capo il coordinatore del progetto (ora BioCemtex) nonché detentore del marchio Proesa™ commercializzato in varie parti del mondo progetto (<http://www.biochemtex.com/>) che sottende anche gli sviluppi conseguiti in ambito PRIT.

Un generico processo in grado di trasformare biomasse ad alto contenuto di cellulosa in etanolo prevede quattro fasi principali:

- ✚ Destrutturazione delle fibre lignocellulosiche per via fisico-chimica (*pretrattamento*);
- ✚ Trasformazione dei polisaccaridi (cellulosa ed emicellulosa) in zuccheri semplici (*idrolisi*);
- ✚ Trasformazione degli zuccheri a etanolo (*fermentazione*);
- ✚ Separazione e purificazione dell'etanolo prodotto (*distillazione*).

La produzione di etanolo di seconda generazione nasce dall'esigenza di proporre un'alternativa ai combustibili di origine fossile. Il Protocollo di Kyoto del 1997 e la Direttiva EU del 2003 impongono l'uso del 5,75% di biocarburanti entro il 2010 e del 10% entro il 2020.

La necessità di sostituire il 10% di carburanti di origine fossile, a parità di potere calorifico, con carburanti da fonti rinnovabili entro il 2020, si traduce in un'esigenza, a livello europeo, di circa 16 milioni ton/anno di bioetanolo e circa 23 milioni ton/anno di biodiesel.

L'obiettivo del progetto è stato quindi lo studio e lo sviluppo di una tecnologia per il primo step del processo per la produzione di bioetanolo: il pretrattamento della biomassa lignocellulosica.

Il risultato finale del pretrattamento è quello di rendere maggiormente accessibili e reattivi i polimeri della cellulosa e della lignina e di solubilizzare la gran parte dell'emicellulosa, sotto forma di pentosani (xilosio, arabinosio...).

Il pretrattamento è lo step che influisce anche maggiormente sul costo del processo totale per la produzione di bioetanolo: circa il 20%.

E' importante ottimizzare il processo e le condizioni per lo step di pretrattamento perché durante questo processo si possono generare sostanze che agiscono da inibitori negli step successivi del processo per la produzione di bioetanolo da materiale lignocellulosico.

Il progetto, pur concentrandosi sul pretrattamento, ha coperto alcuni aspetti della filiera per la produzione di bioetanolo: a partire dal pretrattamento della biomassa selezionata fino alla produzione di bioetanolo.

L'esecuzione del progetto ha permesso di sviluppare una tecnologia che sarà la base per qualsiasi Bioraffineria che utilizzi materiale lignocellulosico, con la possibilità di aumentarne la competitività.

4.2 GENERALITÀ

L'impiego di biomasse residuali per ottenere bioenergia e *green chemicals* è una concreta possibilità di contribuire allo sviluppo sostenibile. Questi materiali sono composti principalmente da polimeri fenolici (lignina) e hanno grandi potenzialità di utilizzo.

Le biomasse lignocellulosiche opportunamente condizionate, sono utilizzate come substrati di fermentazione e riserva di sostanze aromatiche per produrre biocombustibili o monomeri di base. Successivi processi di separazione, purificazione e sintesi chimica possono essere impiegati per accedere a una gamma di prodotti ampissima.

A tutti gli effetti si evidenzia una versatilità che non ha nulla da invidiare alla petrolchimica.

I processi che trasformano la biomassa lignocellulosica in biocarburanti, etanolo, butanolo, etc. prevedono una serie di stadi di separazione e purificazione [1-5].

Una fase fondamentale di questa trasformazione è la separazione dei tre macrocostituenti, uno stadio chiamato pretrattamento che può essere realizzato in modalità molto varie.

Di particolare interesse è l'utilizzo di vapore saturo, a ca 200°C, che è efficace, economico, a basso impatto ambientale.

Un effetto collaterale dei pretrattamenti idrotermici è la produzione di molecole indesiderate, derivanti dalla disidratazione di alcuni zuccheri, che possono inficiare i successivi stadi di trasformazione.

I pretrattamenti possono essere classificati in:

- ✚ *Chimici*, eseguiti con acidi (H_2SO_4 , HCl , CH_3COOH) o basi ($NaOH$, NH_3) che idrolizzano alcuni tipi di legami chimici tra le macrocostituenti e possono essere spinti fino a produrre zuccheri semplici; oppure solventi (etanolo, metanolo) in grado di rimuovere parzialmente la lignina. Si tratta di processi che comportano un elevato consumo di *chemicals*, e sono caratterizzati da un impatto ambientale elevato [6]
- ✚ *Biologici*, dove sono impiegati microrganismi, tipicamente funghi lignolitici, in grado di metabolizzare la lignina e liberare la matrice fibrosa di carboidrati. Pur essendo efficaci e a basso impatto ambientale, questi metodi, sono poco pratici, perché richiedono lunghi tempi di permanenza della biomassa in appositi bioreattori, dell'ordine delle settimane o mesi [7].
- ✚ *Meccanici*, come ad es. la macinatura, la quale è fortemente energivora e di limitata efficienza [8].

- ✚ *Idro-Termici*, la biomassa viene impregnata, sospesa in acqua, o attraversata da un flusso continuo di acqua, in modalità batch o continua. L'acqua agisce da agente idrolitico e *medium* di solubilizzazione degli oligomeri e dei monomeri, sia dei carboidrati sia della lignina (*hot water treatment*).
- ✚ *Idro-Termo-meccanici*, dove all'azione idrolitica dell'acqua ad alta temperatura si aggiunge la destrutturazione indotta, per esempio, dalla decompressione istantanea della sospensione ad alta pressione e temperatura a condizioni ambientali. Tra questi pretrattamenti, è annoverata la *steam explosion*.

L'idrolisi ha lo scopo di ridurre i carboidrati presenti nella biomassa (cellulosa ed emicellulosa) in zuccheri monomerici, questi ultimi possono essere metabolizzati dai microrganismi per produrre, ad es., etanolo.

L'idrolisi può essere realizzata con agenti chimici o biologici:

- ✚ *L'idrolisi chimica* si basa sull'uso di acidi forti (solforico e cloridrico), ad alta o bassa concentrazione. Pur essendo concettualmente semplice, essa presenta innanzitutto gli svantaggi legati alla necessità di utilizzare apparecchiature costruite con materiali costosi, quindi implica costi d'impianto elevati. Un altro problema importante è l'elevato impatto ambientale. Infatti, nei reflui di processo basati sull'uso di acido cloridrico si ritrovano sostanze aromatiche clorurate, mentre utilizzando acido solforico è necessario neutralizzare e precipitare i solfati che poi devono essere smaltiti. [2].
- ✚ *L'idrolisi biologica* si basa invece sull'azione di enzimi prodotti da funghi o altri microrganismi, ed ha quindi un impatto ambientale molto basso. Per contro, questo metodo è in più complesso e costoso rispetto a quelli chimici, poiché è necessario un pretrattamento della biomassa affinché gli enzimi possano agire efficacemente [9-12].

La fermentazione è una bioconversione che trasforma gli zuccheri in alcool che può essere separato dai brodi mediante distillazione ed essere utilizzato come combustibile alternativo di origine rinnovabile in motori a combustione interna, da solo o miscelato ai combustibili convenzionali [13]. La bioconversione avviene per opera di microrganismi quali il *Saccharomyces cerevisiae* (il comune lievito di birra), che riesce a convertire il glucosio in etanolo con rese molto elevate [14]. Anche due tipi di batteri del tipo *Zymomonas* e alcuni funghi (questi con rese e velocità molto più basse) sono in grado di operare lo stesso processo [15].

La fermentazione degli zuccheri a cinque atomi di carbonio non è così semplice perché è necessario ricorrere a microrganismi e tecniche di fermentazione particolari; in ogni caso le rese in etanolo sono più basse (70-80% del teorico) così come le velocità di reazione e la concentrazione di etanolo raggiungibile nei brodi [16].

Come ogni processo biologico, la fermentazione richiede condizioni controllate di temperatura, pH, aggiunta di micronutrienti, opportuna agitazione, etc. inoltre deve essere controllato il livello di eventuali sostanze tossiche o inibitrici [17].

4.3 IL PRETRATTAEMNTO DI STEAM EXPLOSION

Sui diversi pretrattamenti sono stati condotti test comparativi e innovazioni più o meno efficaci alle diverse scale, la steam explosion è considerata tuttora uno dei più convenienti [18,19,20].

Il processo si basa sull'utilizzo di vapore saturo ad alta temperatura e pressione per rompere i legami chimici tra lignina, cellulosa ed emicellulosa che rendono compatta la biomassa lignocellulosica.

La biomassa è introdotta in un reattore, mantenuto a 15-25 bar con l'introduzione di vapore saturo a 180-230°C, dove permane per alcuni minuti dopoché viene espulsa attraverso una valvola in un serbatoio di espansione insieme a una parte di liquido di condensa. L'effetto termico e idrolitico del trattamento e l'effetto meccanico della decompressione producono lo sfibramento della matrice a livello macroscopico e microscopico insieme ad una parziale solubilizzazione dell'emicellulosa e della lignina. Per questo motivo la *steam explosion* rende la cellulosa più facilmente accessibile agli enzimi e assicura una migliore digestione del substrato.

La severità del trattamento è quantificata mediante una relazione semi-empirica che unisce il tempo di trattamento e la temperatura secondo la relazione semiempirica [21]:

$$R_0 = t \cdot \exp [(T-100) / 14,75].$$

R_0 è chiamato parametro di severità.

Nel seguito riportiamo i risultati di una sperimentazione effettuata sulla paglia di grano, pretrattata mediante un reattore di *steam explosion* operante in continuo e avente capacità di 150 kg_{DM}/h.

4.4 METODI DI DETOSSIFICAZIONE

Sebbene efficace per l'ottenimento di un substrato molto idrolizzabile, la *steam explosion* genera prodotti di degradazione che inibiscono la fermentazione e che, se presenti oltre una certa la soglia devono essere rimossi per l'elevata tossicità,. Queste molecole derivano prevalentemente dai macrocostituenti delle cellule vegetali, come mostrato in Figura 1.

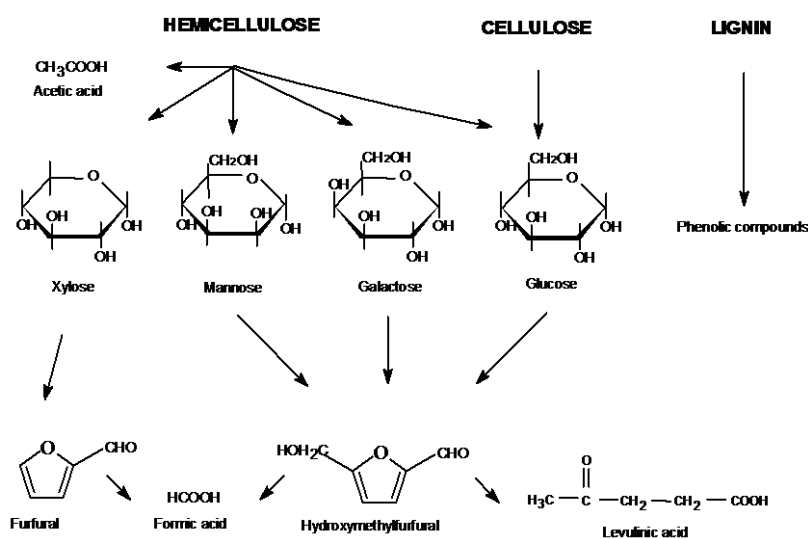


Figura 1. Decomposizione delle biomasse nel corso dei trattamenti idrotermici.

La concentrazione di queste molecole è di qualche punto percentuale in peso, molte sono volatili (acido formico, acido acetico, idrossimetilfurfurale (5-HMF) furfurale) altre, come la benzaldeide, provengono dalla depolimerizzazione della lignina e hanno un punto di ebollizione relativamente alto.

Tali sostanze inibiscono l'azione dei lieviti quando superano una certa concentrazione nei brodi di fermentazione (Tabella 1) fino a bloccarla completamente. Sono stati inoltre evidenziati effetti sinergici tra gli inibitori.

Esistono differenti metodi di rimozione di questi inibitori, ovvero di detossificazione del materiale esploso, al fine di rendere la fermentazione alcolica possibile e con alte rese. Il più comune è sicuramente un lavaggio con acqua, poiché gli inibitori sono per lo più idrosolubili, ma questo sistema comporta anche la rimozione degli oligomeri solubili, soprattutto da emicellulosa, che invece potrebbero accrescere la resa etanolica. Alcuni metodi si basano sull'impiego di reattivi o enzimi (idrossido di calcio, sodio solfito, carboni attivi, laccasi) altri prevedono l'estrazione con solventi organici come etere o etilacetato [23-26].

Tutti questi metodi presentano l'inconveniente di aggiungere *chemicals* al processo, con conseguente aggravamento dei costi e delle problematiche di smaltimento.

Tabella 1. Effetto degli inibitori sulla fermentazione alcolica [22]

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

Un altro metodo prevede l'essiccazione del materiale esploso in stufa a 60 °C per molte ore ma, sebbene questo metodo sia risultato efficace nella rimozione degli inibitori, l'essiccazione genera un ri-arrangiamento delle catene polimeriche di cellulosa indicato nella letteratura tecnica col termine anglosassone *hornification*, che rende la successiva saccarificazione meno efficace [27].

Per accelerare la rimozione degli inibitori mediante essiccamento, e ridurre gli effetti della *hornification* (mediante accorgimenti descritti in seguito), è stato preso in considerazione l'impiego di un essiccatore a pale cave disponibile commercialmente.

4.5 L'ESSICCATORE CON APPARECCHIATURA PALE CAVE

Questo macchinario consiste in una camera cilindrica orizzontale (in acciaio inox), all'interno della quale i materiali vengono miscelati ed essiccati per contatto con un agitatore rotante a pale cave mantenuto caldo da un fluido circolante internamente (olio diatermico o acqua).

Oltre che dalla superficie delle pale, il calore è trasmesso al materiale dalla camicia metallica che riveste internamente la camera di essiccamento e dalla superficie esterna albero rotante. L'apparecchiatura è usata correntemente per riscaldare, sterilizzare, calcinare (o anche raffreddare) solidi e assicura uno scambio termico elevato e uniforme.

La velocità di rotazione tra 5 e i 60 r.p.m assicura una miscelazione del materiale molto efficiente.

Questo tipo di essiccatore è utilizzabile per materiali dalla distribuzione particellare e dalla consistenza molto variabili. Sono note applicazioni in campo metallurgico per l'essiccazione di sali minerali, ma anche nel settore agroalimentare e perfino farmaceutico.

In Figura 2 è riportato uno schema dell'apparecchiatura, in Figura 3 il dettaglio delle pale cave (sezione) e in Figura 4 le foto di modelli commerciali.

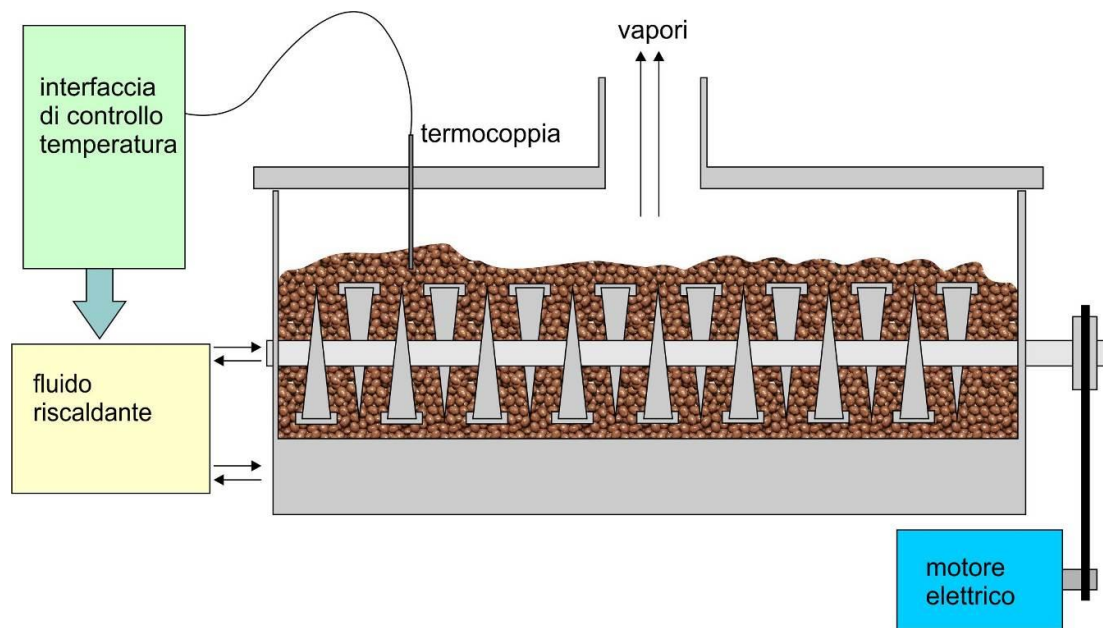


Figura 2: Schema dell'essiccatore a pale cave.

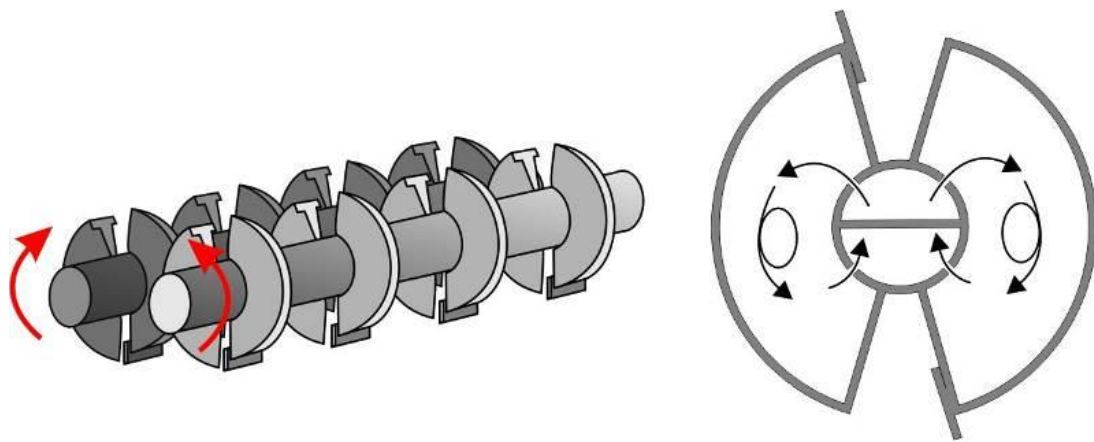


Figura 3: Schema delle pale cave, a destra una sezione con le direzioni di circolazione del fluido.

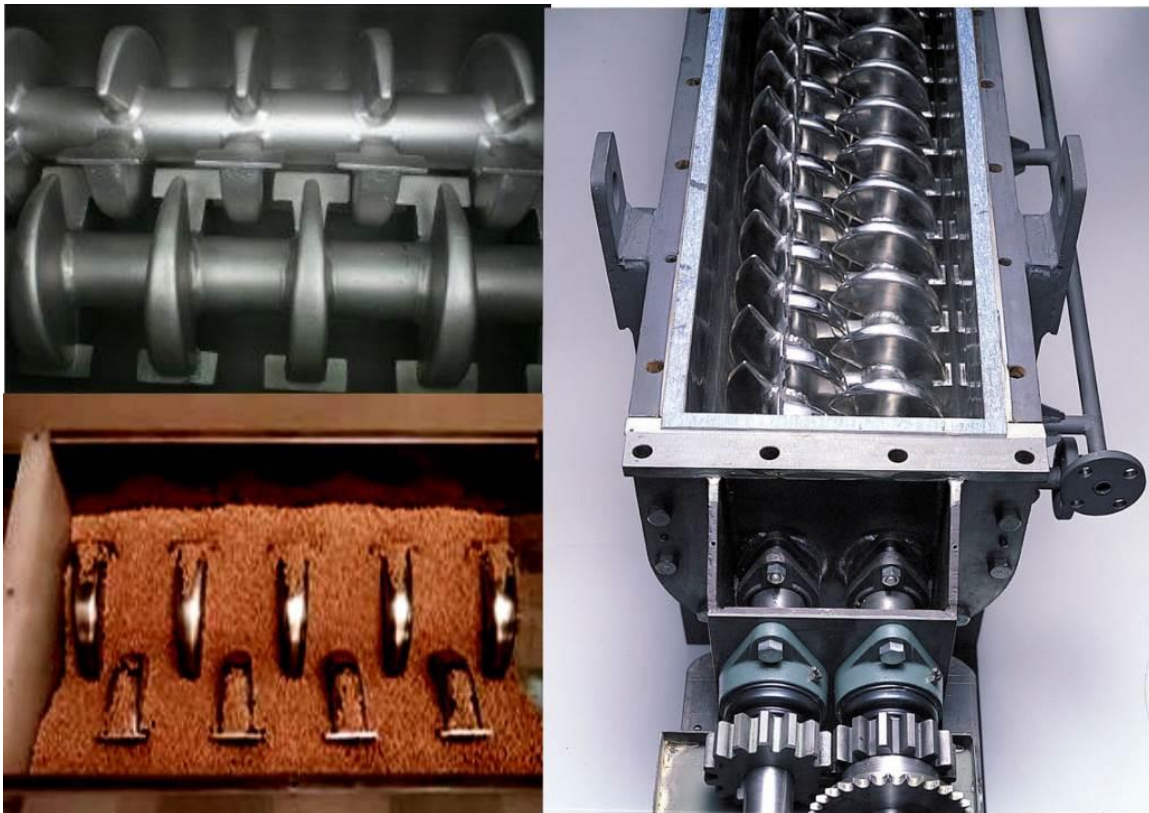


Figura 4: Dettagli di macchine commerciali (fonte: <http://www.nara-e.de>).

Nel lavoro di cui riportiamo i risultati, è stato utilizzato un essiccatore a pale cave con una camera di essiccazione di circa 20 litri. Come substrato, è stato utilizzato paglia di grano pretrattata con *steam explosion* secondo modalità e parametri ottimizzati in altre campagne [5,18,28].

È stata sperimentata l'efficacia della rimozione degli agenti inibitori nel substrato, sia mediante analisi degli stessi nel residuo trattato, sia mediante test di fermentazione.

In seguito la macchina è stata provata come reattore di idrolisi per aumentare l'efficienza della digestione enzimatica in sospensioni ad elevato rapporto solido liquido (circa 40%), per la quale occorre un sistema di mescolamento e scambio termico particolarmente efficiente.

5. METODOLOGIA SPERIMENTALE

5.1 MATERIALI

La biomassa utilizzata è stata la paglia di grano (*Triticum* spp.) proveniente da coltivazioni locali (area del Metapontino) e umidificata al 50% immediatamente prima del pretrattamento. Per le prove di idrolisi sono stati utilizzati enzimi commerciali: Cellic Ctec2 (Novozymes). Come lievito è stato utilizzato un ceppo di *S. cerevisiae*, commercialmente disponibile come liofilizzato. I reattivi utilizzati per la chimica preparativa e le analisi strumentali sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (reagenti puri per analisi).

5.2 PREPARAZIONE DELLA BIOMASSA ESPLOSA

La biomassa è stata tritata mediante uno *straw chopper* per avere una pezzatura media di 2 cm, quindi umidificata e caricata nel reattore continuo di *steam explosion* (impianto STELE - Steam Explosion Legno - operante presso il C.R. ENEA della Trisaia, MT), in grado di trattare circa 300 kg/h di biomassa (150 kg/h su base secca); la paglia è stata trattata a 210 °C per 6 minuti, in modo da ottenere un substrato idoneo per un'efficiente idrolisi enzimatica [28].

Il materiale esploso è stato raccolto in fusti da 100 litri, quindi mescolato e conservato ancora umido in buste sigillate sottovuoto a temperatura ambiente (10 pacchi da 6 kg cad.).

5.3 USO DELL'ESSICCATORE A PALE CAVE PER LA DETOSSIFICAZIONE DELL'ESPLOSO

Per le prove di detossificazione della biomassa esploso con l'essiccatore a pale cave è stato utilizzato un modello batch di piccola taglia, fornitoci dall'azienda olandese MFG-Gouda (www.gmfgouda.com), e mostrato in Figura 5.

Con questa macchina sono stati trattati circa 6 kg di esploso per prova, con velocità di rotazione delle pale a 40 rpm (variabile da 20 a 60 rpm).

Le pale cave e la camicia esterna erano riscaldate mediante l'innesto di acqua calda, monitorando la temperatura mediante una termocoppia immersa nel substrato.

Il controllo della temperatura era assicurato dall'interfaccia del Biostat-D (B. Braun Biotech International).

Il sistema Gouda è dotato di un coperchio superiore (removibile) con apertura circolare per l'aspirazione dei volatili; può essere quindi collegato a sistemi da vuoto e a condensatori per l'aspirazione e la raccolta dei condensabili.



Figura 5: Essiccatore a pale cave esercito per le prove presso il CR Trisaia

Nelle prove di detossificazione della biomassa esplosa, l'essiccatore a pale cave è stato utilizzato nelle seguenti differenti configurazioni:

- a) *Essiccazione diretta*: è un processo di essiccazione rapida senza coperchio si possono rimuovere completamente i volatili (fig. 6).

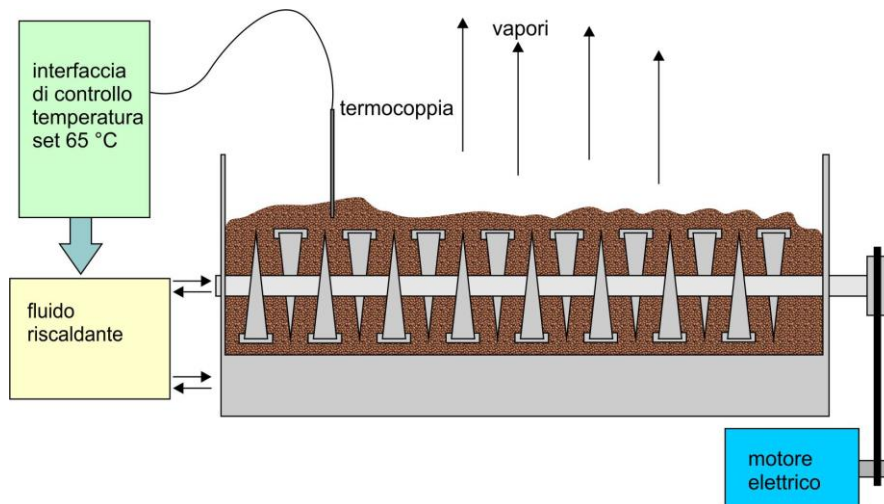


Figura 6: Essiccazione diretta senza recupero dei condensati.

- b) *Allontanamento degli inibitori e umidificazione continua della biomassa*. Alla configurazione a si aggiunge una serie di ugelli che nebulizzano acqua, in modo da mantenere sempre un po' umida la biomassa anche durante l'evaporazione (Figura 7).

Questo accorgimento ha lo scopo di evitare l'*hornification* che sopraggiunge quando la biomassa è completamente disidratata e che causa la diminuzione dell'efficienza di saccarificazione [27]. Il flusso di acqua viene regolato manualmente in modo da mantenere la biomassa umida all'incirca al 50%.

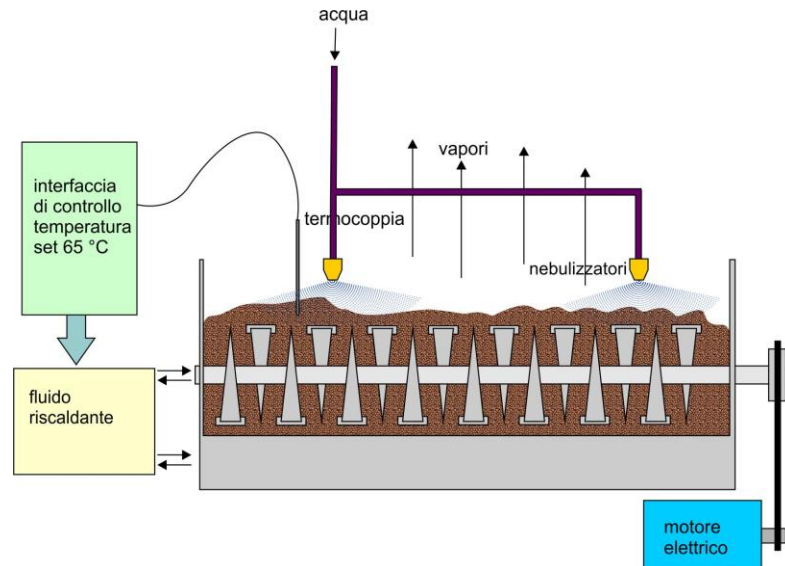


Figura 7: Allontanamento degli inibitori con pale cave e umidificazione continua del substrato.

- c) *Essiccazione con coperchio, aspirazione a vuoto e recupero dei condensati:* consente di recuperare i condensabili, raccolti in un pallone a valle di un refrigeratore. In questo caso la rimozione dei volatili è stata agevolata dal vuoto prodotto da una pompa rotativa ad olio (fig. 8).

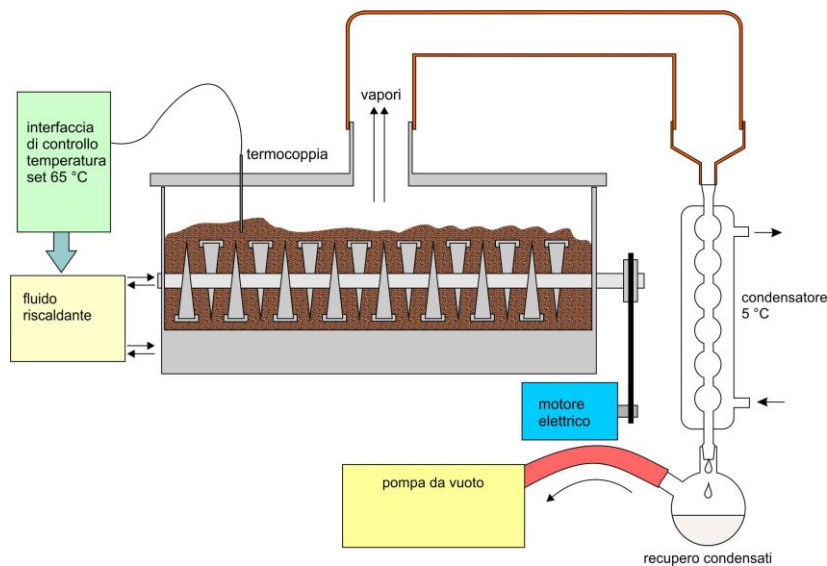


Figura 8: Essiccazione con coperchio, vuoto e recupero dei condensati.

- d) *Rimozione dei volatili con umidificazione continua, vuoto e recupero dei condensati*: in pratica la configurazione c, umidificando continuamente la biomassa per conservarne le caratteristiche fisiche di partenza. L'umidificazione avviene per mezzo di ugelli da cui viene spruzzata acqua con una portata pari al volume del condensato raccolto (fig. 9).

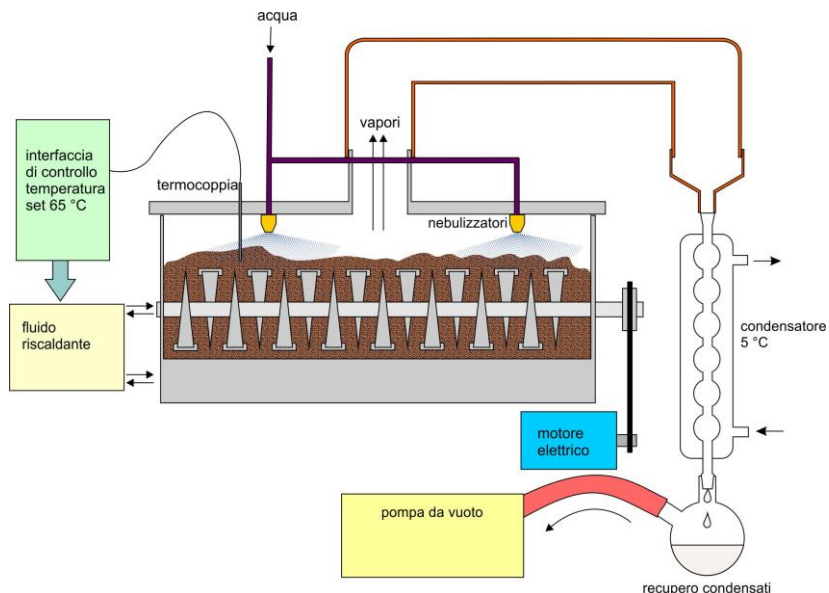


Figura 9: Rimozione dei volatili con umidificazione continua, vuoto e recupero dei condensati.

Rimozione dei volatili in flusso di vapore acqueo: in questo caso il sistema c viene modificato inserendo un iniettore di vapore sul fondo (fig. 10), con lo scopo di aumentare l'efficacia della rimozione grazie alla corrente di vapore che trascina con sé i volatili (*stripping*). Con questo metodo la biomassa è mantenuta umida come nel sistema c.

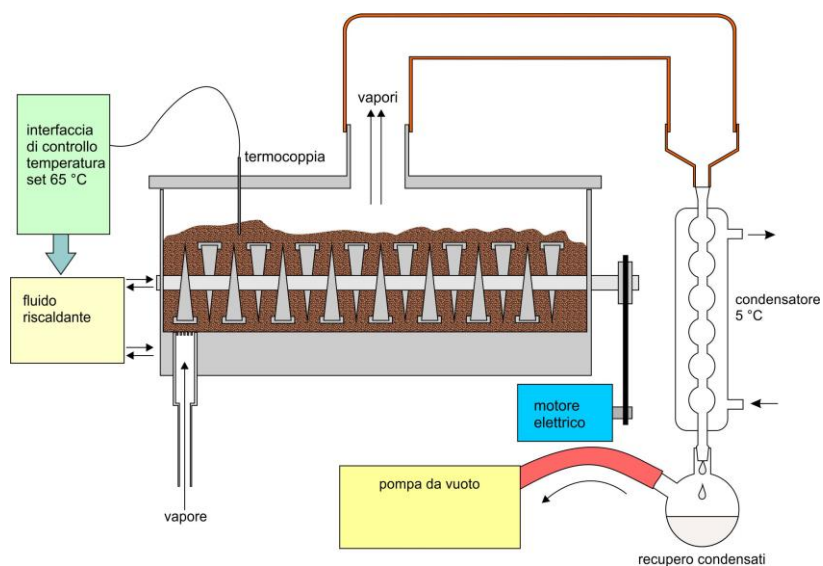


Figura 10: Rimozione dei volatili sotto flusso di vapore acqueo.

5.4 IDROLISI ENZIMATICA E FERMENTAZIONE

Le idrolisi enzimatiche sono state condotte in bottiglie chiuse da 200 ml. Per un confronto diretto sono stati considerati sia i substrati ottenuti dopo il trattamento con l'essiccatore a pale cave, sia i substrati esplosi non trattati. Il dosaggio enzimatico è stato del 6% ($\frac{\text{g}_{\text{soluzione enzimatica}}}{100\text{g}_{\text{biomassa secca}}}$). La biomassa trattata è stata sospesa in soluzione a pH 5 con tampone citrato 20 mM, usando un rapporto solido/liquido variabile nell'intervallo 5-40%.

La temperatura è stata impostata a 50 °C, termostatando le bottiglie tramite incubatore per una durata di reazione pari a 48 h. L'agitazione in agitatore orbitante è stata di 150 rpm.

Le fermentazioni sono state condotte direttamente sugli idrolizzati, aggiungendo il lievito *S. cerevisiae* (3 g/l), estratto di lievito (2,5 g/l), ammonio fosfato tribasico (0,25 g/l) e magnesio solfato (0,025 g/l).

Per evitare contaminazione batterica sono stati aggiunti 0,2 g/l di antibiotico (Ampicillina).

Alcune prove di idrolisi enzimatica sono state condotte direttamente nell'essiccatore a pale cave: in questo caso particolare è stato utilizzato un rapporto solido/liquido pari al 40% (circa 4 kg di esploso, con dry matter al 50%, e 3 kg di soluzione idrolitica), tutti gli altri parametri, pH, temperatura e dosaggio enzimatico sono stati utilizzati come sopra.

Le prove di idrolisi sono state condotte per 24 ore in pale cave previa detossificazione del materiale (configurazione *b*, 40 minuti), dopodiché, a liquefazione avvenuta, le idrolisi sono state protrate per altre 48 ore in beuta.

5.5 CARATTERIZZAZIONE E ANALISI CHIMICHE

Determinazione delle ceneri

Il metodo consente la determinazione del residuo che si ottiene in seguito a lenta combustione della biomassa a 600° C, in muffola (rampa di 100°C/h fino a 600 °C, quindi 8 ore a 600 °C). La percentuale di ceneri è indicativa del contenuto di materiale inorganico presente in un campione. Il campione impiegato per la determinazione delle ceneri è stato macinato a 50 mesh ed essiccato a 60° C.

Determinazione degli estrattivi

L'operazione è effettuata in estrattori Soxhlet per 8 ore con una miscela etanolo/toluene 1:2 v:v, in grado di estrarre oli, resine, cere, grassi e alcune gomme solubili. Il campione sul quale si esegue l'estrazione è stato preventivamente macinato a 50 mesh e seccato in stufa a 60 °C fino a peso costante. Il materiale estratto è stato recuperato per allontanamento del solvente con rotavapor, quindi seccato in stufa a 60 °C ed infine pesato.

Determinazione della lignina e dei carboidrati mediante il metodo Klason

L'idrolisi primaria dei carboidrati presenti nel campione è stata eseguita con acido solforico al 72% w/w. Circa un grammo di campione è stato pesato in un Becker ed addizionato di acido solforico, quindi sottoposto ad agitazione per due ore in un bagno termostato a 20°C. L'idrolisi acida è stata completata diluendo il campione con acqua fino a portare la concentrazione di acido solforico al 3% w/w e facendo bollire il tutto per altre quattro ore.

La sospensione risultante contiene una parte insolubile che viene recuperata mediante filtrazione e pesata: essa costituisce la lignina insolubile. La soluzione invece è stata portata ad 1 L, e su essa

sono state effettuate le determinazioni di lignina solubile, leggendo l'assorbanza a 205 nm mediante spettrofotometria di assorbimento UV.

Il contenuto di lignina in soluzione è calcolato mediante la formula:

$$\text{lignina (g/l)} = A/B \times C$$

dove:

A = assorbanza a 205 nm della soluzione

B = coefficiente di estinzione 110 L/(g x cm)

C = fattore di diluizione.

Gli zuccheri presenti nella soluzione sono stati determinati mediante cromatografia ionica HIPC. L'analisi è stata condotta mediante la strumentazione cromatografica DIONEX, modello DX 500. Come eluente è stata impiegata una soluzione di NaOH a gradiente di concentrazione (2-200 mM). Il rivelatore impiegato è di tipo elettrochimico ad amperometria pulsata.

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

Analisi dei brodi di idrolisi e fermentazione

I brodi di fermentazione sono stati analizzati prelevando dalle beute aliquote di campione e, dopo opportuna diluizione e filtrazione, analizzandoli con un cromatografo ionico (HPIC DIONEX, colonna Nucleogel OA40, eluente H₂SO₄ 0.1 N, rivelatore RI), grazie al quale è possibile determinare il quantitativo di glucosio ed etanolo nell'intervallo 0-800 ppm.

Mediante questo metodo è possibile quantificare anche l'acido acetico.

Analisi degli inibitori

Gli inibitori volatili, come acido formico, 2-furfurale, 5-idrossimetilfurfurale e 4-hydroxybenzaldehyde, sono stati quantificati mediante HPLC (serie HP1100) con rivelatore DAD, colonna Phenomenex Synergi Fusion-RP 80, e, come eluente, gradiente di acetonitrile acqua (0-15 min, CH₃CN 3%; 15-27 min, CH₃CN 10%; 27-35 min, CH₃CN 17%; 35-50 min, CH₃CN 30%; 50-60 min, CH₃CN 50%). La colonna lavora ad una temperatura fissa di 30 °C ed è stato utilizzato un mix di standard di riferimento con calibrazione tra 6 e 60 ppm.

Questi inibitori (solubili in acqua) e l'acido acetico, sono stati determinati sia nel condensato raccolto, sia nel solido trattato, previa estrazione dello stesso con volumi noti di acqua distillata.

6.

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1 PREPARAZIONE E ANALISI DEI SUBSTRATI

Il materiale ottenuto dopo il trattamento della paglia mediante steam explosion (210 °C per 6 min.) si presenta particolarmente sfibrato, di colore marrone scuro (Figura 11) e con un peso secco del 58%.



Figura 11: Campione di paglia di grano dopo pretrattamento di *steam explosion*

A valle del trattamento nell'essiccatore a pale cave, i campioni sono stati recuperati e caratterizzati, quindi le composizioni sono state confrontate con i materiali di partenza. Per questa sperimentazione sono state utilizzate le configurazioni *a* e *b* (essiccazione completa e impiego dello spray d'acqua rispettivamente). Tutti i dati sono stati ricavati sui campioni successivamente seccati in stufa; i valori sono riportati in Tabella 2.

Il bilancio di materia dei prodotti ottenuti non chiude al 100%, poiché la metodica Klason non consente di determinare le sostanze acido-solubili diverse da carboidrati e lignina. Il complemento a 100 è stato per ipotesi considerato materiale organico non volatile indeterminato (nd). Gli effetti di degradazione da parte del trattamento di *steam explosion* in teoria agiscono sulla parte organica della biomassa, come i carboidrati, trasformandoli in composti volatili come ad esempio acido acetico e furfuroli. In base a tali considerazioni il contenuto di materiale inorganico della biomassa, in termini assoluti, si mantiene costante. Il valore delle ceneri può essere quindi usato come tracciante per la determinazione della perdita di massa sotto forma di materiale volatile. I dati di Tabella 2 sono stati elaborati per determinare la ripartizione della biomassa durante le fasi di trattamento. I risultati sono riportati in Tabella 3, dove viene riportato anche il valore teorico del materiale volatile dopo i trattamenti. Come si evince dalla Tabella 3, le analisi dei substrati indicano che l'effetto della *steam explosion* induce dei cambiamenti nella struttura della biomassa e tali cambiamenti riguardano in modo particolare l'emicellulosa. Infatti, lo xilano passa dal 19% nella paglia al 7% nel materiale esplosivo. Tali riduzioni riguardano anche gli altri carboidrati, anche se in maniera minore. Il fenomeno è ben documentato in letteratura [17, 29, 30].

Il trattamento nelle pale cave, che opera a 65 °C ha qualche effetto sulla composizione dato che la percentuale di glucano e xilano si riduce di qualche punto percentuale. La loro trasformazione non sembra procedere verso sostanze volatili, il cui valore si mantiene pressoché costante, ma probabilmente con la lignina per produrre pseudolignina, difficilmente analizzabile in dettaglio (aumenta nd).

Nel caso del glucano, il componente più importante per ottenere etanolo, queste reazioni secondarie sembrano essere rallentate nella modalità *b* (spray di acqua).

Tabella 2. Composizione della paglia (RM), della paglia esplosa (ES) e degli esplosi trattati con l'essiccatore a pale cave (PC) sia a secco (configurazione *a*) che a umido (configurazione *b*).

Costituente	RM		ES		ES PC secco		ES +PC umido	
	%(w/w)	sd	%(w/w)	sd	%(w/w)	sd	%(w/w)	sd
Ceneri	6,9	0,1	8,18	0,08	8,12	0,02	8,16	0,08
Lignina K + estrattivi*	28	4	32,6	0,6	33,7	0,5	34,7	0,6
Lignina solubile	2,02	0,05	3,43	0,05	3,6	0,3	3,62	0,04
Arabinano	2,3	0,2	0,23	0,02	0,338	0,005	0,325	0,006
Galattano	0,74	0,06			0,55	0,02	0,588	0,006
Glucano	38	3	40,5	0,3	34,2	0,4	37	1
Xilano	19,4	0,7	8,5	0,2	6,6	0,2	5,7	0,2
totale	97,4		93,4		87,1		90,1	

*nel caso della paglia tal quale (RM) gli estrattivi sono stati determinati separatamente dal residuo insolubile Klason (Lignina K), risultando: estrattivi 8,4%, lignina K 20%.

Tabella 3. Variazione della composizione della paglia (RM) in seguito alla steam explosion (ES), e al trattamento con pale cave (PC) nelle configurazioni *a* e *b*.

	RM	ES	ES+PC (a)	ES+PC (b)
	%(w/w)	%(w/w)	%(w/w)	%(w/w)
Ceneri %	6,9	6,9	6,9	6,9
Lignina K + estrattivi	28	27,5	28,6	29,3
Lignina solubile %	2,02	2,89	3,0	3,06
Arabinano %	2,3	0,19	0,29	0,27
Galattano %	0,74	-	0,47	0,50
Glucano%	38	34,2	29,1	31,3
Xilano %	19,4	7,2	5,6	4,8
nd	2,6	5,5	11,0	8,4
totale secco	100	84,4	85,0	84,6
volatile	-	15,6	15,0	15,4

7.2 ANALISI DEGLI INIBITORI

La rimozione degli inibitori è stata verificata analizzando la biomassa nel corso del trattamento. In tale modo è stato possibile stimare la durata minima del trattamento per ottenere un prodotto detossificato. La prova è stata effettuata utilizzando la configurazione *a* (Figura 6) e con la configurazione *b*. L'essiccazione completa del materiale, che parte da un livello di umidità del 42%, avviene in tempi abbastanza rapidi, ovvero dopo appena 40 minuti di trattamento (Figura 12).

Lo stesso campione si essicca completamente in stufa dopo circa 2-4 ore a 100 °C e dopo 10-20 h a 65 °C a seconda della geometria del contenitore e dello spessore dello strato di materiale.

L'efficacia delle pale cave nell'essiccazione della biomassa esplosa è dunque senza dubbio molto alta.

Tuttavia, soprattutto nella fase finale del trattamento, la rapida movimentazione del materiale provoca la formazione di particelle fini che sono trascinate per semplice convezione dell'aria fuori dalla camera dell'essiccatore. È da prevedere quindi un sistema di contenimento delle polveri che non rallenti però l'allontanamento dei vapori.

In Figura 13 è riportato il contenuto di alcuni inibitori nel materiale all'inizio, a metà e a fine trattamento dopo 60 minuti: si osserva che la rimozione del 2-furfurale è abbastanza marcata, mentre il catecolo e il 5-idrossimetilfurfurale non subiscono significative riduzioni.

La rimozione dell'acido acetico è al 14% del valore iniziale, una riduzione sufficiente a rientrare nella soglia di tollerabilità da parte dei microrganismi etanologeni.

Con il sistema *b* l'andamento della rimozione degli inibitori è simile a quello riscontrato nella configurazione *a*, ma più efficace, e il tenore di inibitori nel materiale è molto inferiore (Figura 14).

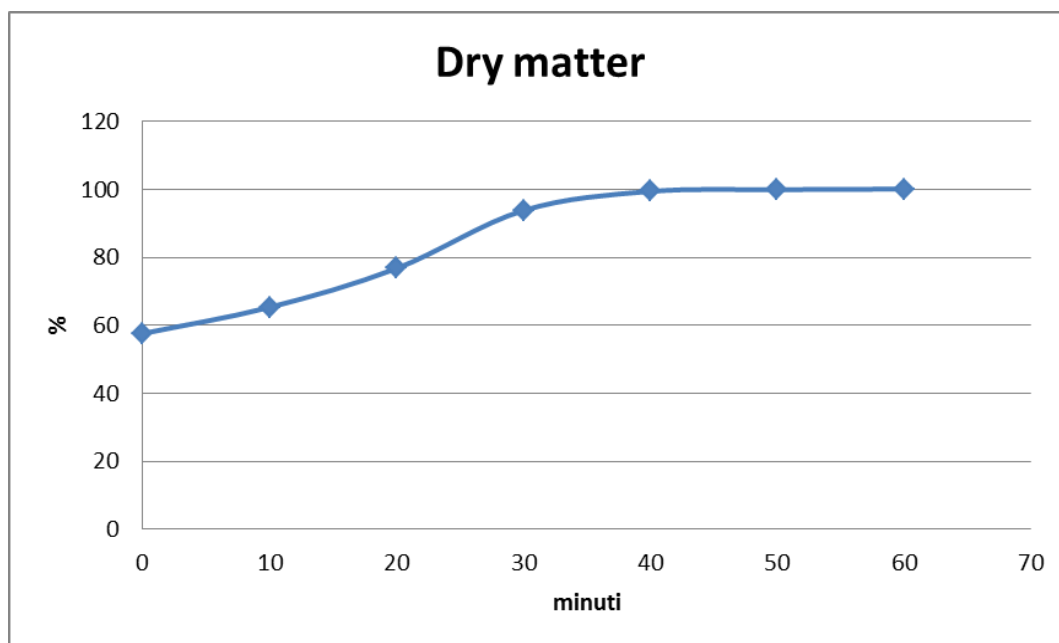


Figura 12: Essiccazione del materiale esplosa nel sistema a pale cave utilizzando il procedimento con configurazione *a*.

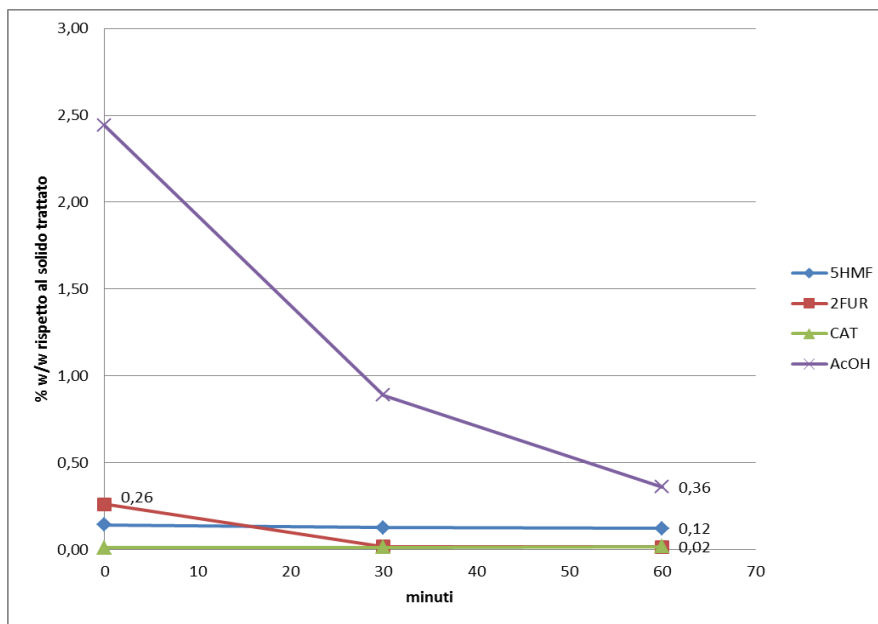


Figura 13: Contenuto di alcuni inibitori nel materiale esplosivo a diversi tempi di trattamento con la configurazione *a*: 5HMF idrossimetilfurfurale, 2FUR furfurale, CAT catecolo, AcOH acido acetico.

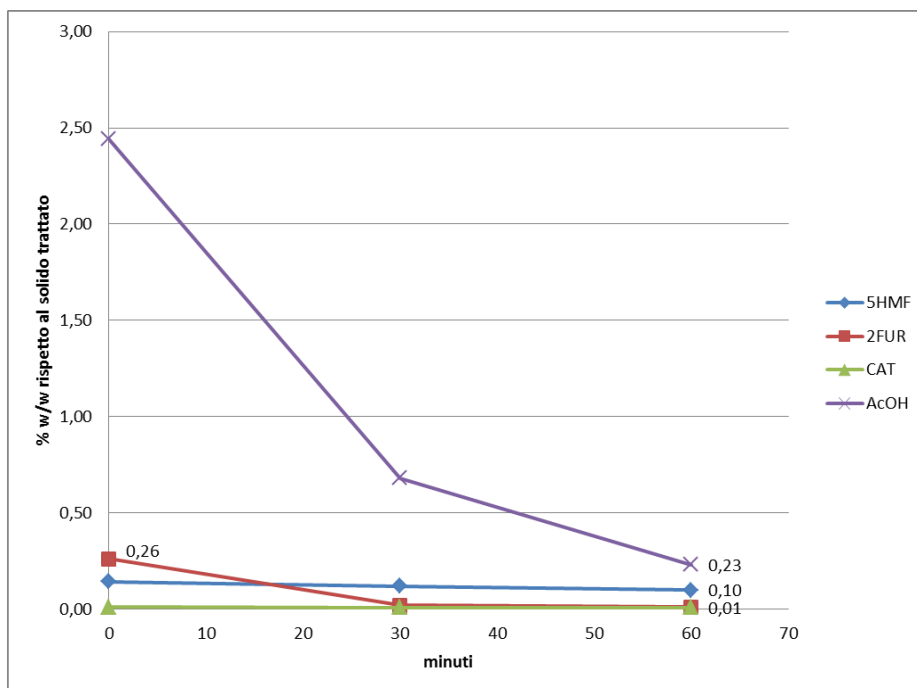


Figura 14: Contenuto di alcuni inibitori nel materiale esplosivo a diverse fasi di trattamento con la configurazione *b*, 5HMF idrossimetilfurfurale, 2FUR furfurale, CAT catecolo, AcOH acido acetico.

Utilizzando il sistema nella configurazione *c* (Figura 8), è possibile recuperare il condensato. Questo sistema tuttavia non consente una completa essiccazione del materiale, a meno di impiegare tempi molto lunghi (superiori alle 4 ore). Infatti, è stato verificato che la maggior parte dei vapori condensa sulla superficie interna del coperchio, ricadendo sul materiale e rallentando l'essiccazione. Dopo 2 ore di trattamento sono stati recuperati circa 0,5 litri di condensato, a fronte di circa 2,5 litri di acqua presente nel campione di partenza.

La geometria del sistema, qualora si volesse operare con sistema chiuso e recupero dei condensati, deve essere adattata a questo tipo di materiale.

Una prova è stata eseguita collegando un aspiratore diretto alla bocca del coperchio: sebbene l'essiccazione sia diventata più rapida, molto del materiale fine è stato aspirato insieme ai vapori.

Il problema non si manifesta umidificando la biomassa (configurazione *b* e *d*). In questo caso, la biomassa si mantiene bagnata e non si forma polvere asciutta.

Eseguendo la sperimentazione nella configurazione *d*, è stato determinato il contenuto di alcuni inibitori sia nel condensato raccolto, sia nel materiale trattato. Partendo da circa 6 kg di paglia esplosa è stata eseguita una prova della durata di 120 minuti, monitorando il volume del condensato raccolto e prelevando campioni di solido per l'analisi degli inibitori residui.

Nella Figura 15 è riportato l'andamento della raccolta di condensato e del contenuto di furfurale.

Il flusso medio di condensato è stato 4,3 ml/min., mentre la concentrazione di furfurale nel batch finale di condensato risultava di 0.54%.

Nel condensato sono presenti in tracce, di 5-idrossimetilfurfurale (5-HMF), catecolo, siringaldeide, idrossibenzaldeide e acido formico.

Sul materiale secco sono stati determinati gli inibitori residui. I dati sono riportati in Figura 16, dove è possibile evidenziare la rilevante rimozione del furfurale.

Rispetto all'essiccazione rapida effettuata con il sistema *a*, senza coperchio, la rimozione di questo è parziale nella configurazione *c*, rilevando infatti il dimezzamento della concentrazione iniziale (da 0,26% a 0,14%), contro la quasi totale rimozione osservata con il sistema *a* (da 0,26% a 0,02%). Per effetto dell'umidificazione continua, il dry matter (DM) del materiale sottoposto a trattamento rimane pressoché costante, vicino al 60%.

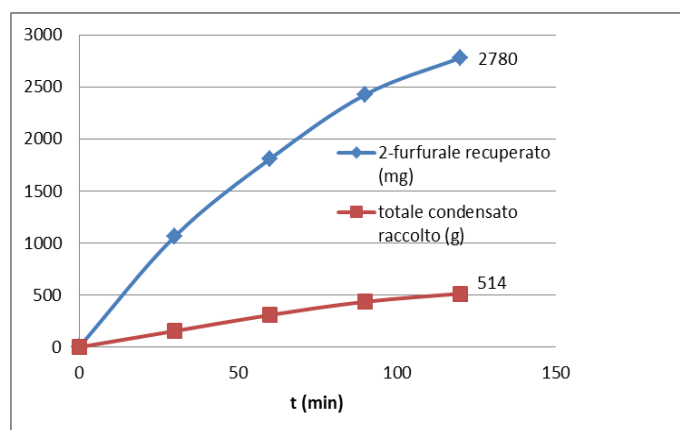


Figura 15: Recupero del condensato totale (rosso) e del furfurolo in esso contenuto (blu) durante la prova con la configurazione *c*.

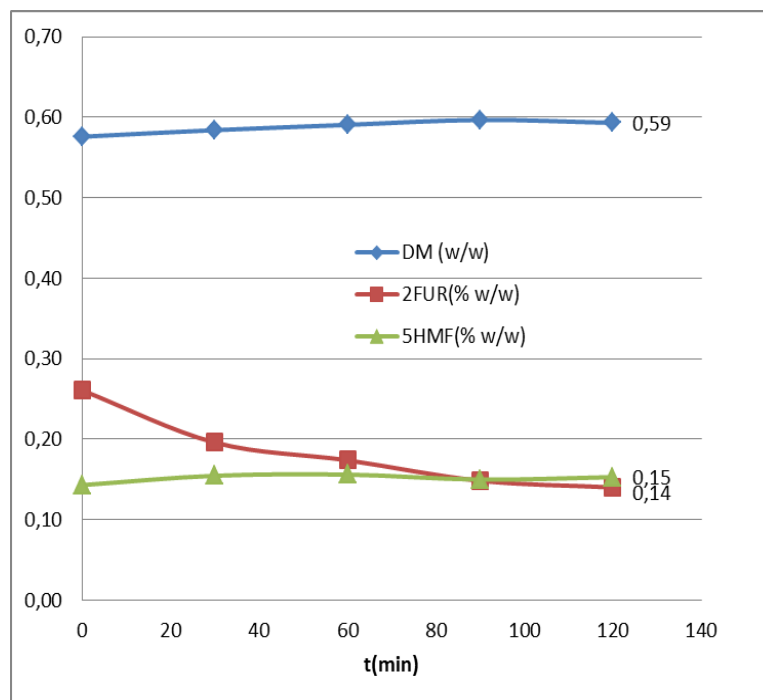


Figura 16: Analisi del furfurale e dell'idrossimetilfurfurale nel solido trattato durante la prova con la configurazione *c*.

La sperimentazione condotta con la configurazione *e*, cioè con l'iniettore di vapore, non ha mostrato risultati differenti rispetto alle prove condotte con le configurazioni *c* e *d*. Per inciso, in questo caso sono stati analizzati soltanto i campioni solidi, prelevati in 3 diverse zone dell'essiccatore: nelle dirette vicinanze dell'insufflatore di vapore, nel punto più lontano da esso, ed un terzo nella zona intermedia.

Ogni campione solido è stato sottoposto a lavaggio acquoso e sulle acque di lavaggio sono stati determinati gli inibitori.

Dopo 2 ore di trattamento non è stata riscontrata nessuna differenza tra i campioni in termini di contenuto di inibitori.

7.3 PROVE DI IDROLISI ENZIMATICA E FERMENTAZIONE

Sebbene la determinazione degli inibitori nel materiale trattato fornisca un'indicazione sul possibile raggiungimento della detossificazione della biomassa esplosa, sono le prove di idrolisi enzimatica e fermentazione alcolica che permettono di definire in maniera conclusiva l'efficacia del metodo.

A tale proposito sono state eseguite una serie di prove comparative di idrolisi e fermentazione separate, SHF, con lo scopo di verificare gli effetti del trattamento sia sull'azione enzimatica che sul lievito.

Le prove sono state condotte su esplosa tal quale e su esplosa trattato con pale cave nelle configurazioni *a* e *b*, quest'ultime dimostratesi più rapide ed efficaci nella rimozione del furfurale. Sono stati eseguiti i test a differente carico di substrato nella sospensione idrolitica; questo per verificare l'esistenza di una soglia di inibizione all'aumentare della concentrazione degli inibitori

solubili. In particolare le prove sono state condotte utilizzando rapporti solido liquido S/L a 5%; 10%; e 20%.

Dopo 72 ore di idrolisi enzimatica a 50 °C, la temperatura è stata abbassata a 30 °C quindi sono stati aggiunti il lievito e i nutrienti.

L'efficacia dell'idrolisi enzimatica è stata verificata sia nelle prime 72 ore, che alla fine della fermentazione, cioè dopo 144 ore, ricavando il glucosio teorico dalla conversione stechiometrica dei metaboliti: etanolo, acido lattico, glicerolo e acido acetico (quest'ultimo decurtato da quello già presente nel substrato, vedi figure 12 e 13).

In Figura 17 sono riportati i quantitativi di glucosio prodotto dopo le 72 ore di idrolisi enzimatica. Sebbene il materiale trattato con pale cave contenga meno glucano (Tabella 2), è interessante osservare come, nel caso del materiale trattato a umido, la quantità di glucosio prodotto sia stato superiore, deducendo da ciò un miglioramento nella resa di idrolisi.

Analogamente, in Figura 18, è riportato il quantitativo di xilosio prodotto.

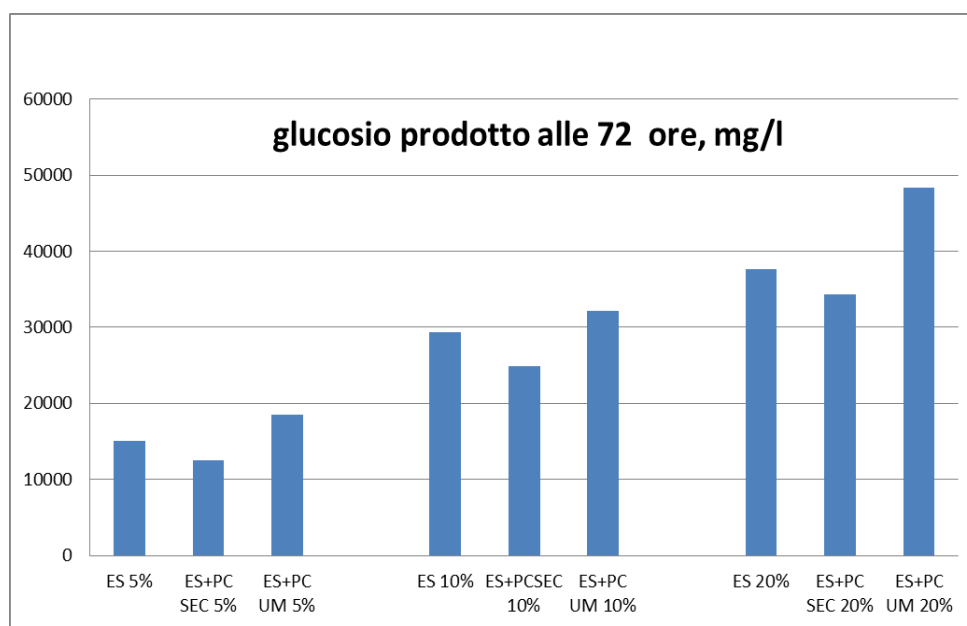


Figura 17: Glucosio ottenuto in soluzione dopo 72 ore di idrolisi enzimatica (ES 5%; esploso idrolizzato in sospensioni a rapporto S/L 5%).

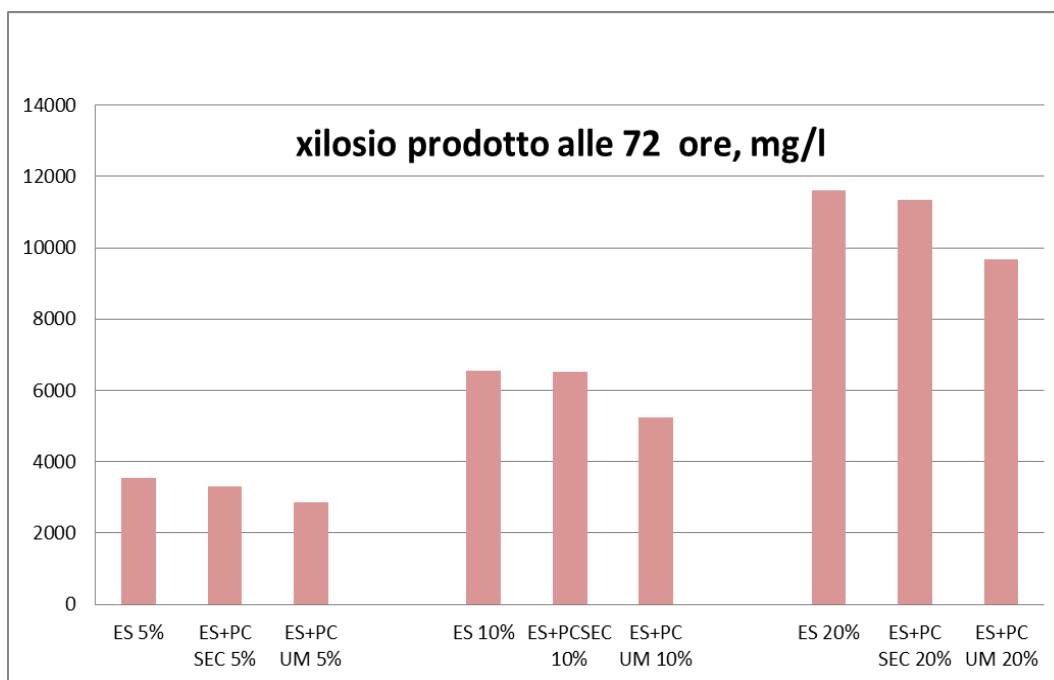


Figura 18: Xilosio ottenuto in soluzione dopo 72 ore di idrolisi enzimatica (ES 5% ; esplosio idrolizzato in sospensioni a S/L 5%).

L'efficacia dell'idrolisi enzimatica può essere quantificata rapportando i monomeri prodotti rispetto al contenuto di polimero nel materiale di partenza: le rese di idrolisi enzimatiche, riportate nei grafici di figure 19 e 20, permettono di valutare l'efficacia dell'essiccatore a pale cave nel migliorare l'efficienza di idrolisi.

È possibile osservare che nel caso del trattamento a umido vi sia un vistoso incremento nella resa di idrolisi della cellulosa. Ciò può essere attribuito ad uno sminuzzamento ulteriore della fibra per l'effetto meccanico delle pale cave in rapida rotazione.

Nel caso del trattamento a secco, tale effetto è controbilanciato dal fenomeno dell' "hornification". Da ciò risulta che non vi siano differenze di resa tra l'esplosio tal quale e quello trattato con pale cave fino a completa essiccazione. Viceversa, nel caso dello xilosio, si osserva un aumento di resa in tutti e due i materiali trattati con le pale cave.

In tutti i casi si osserva una diminuzione di resa all'aumentare del rapporto S/L, a causa dell'inibizione dell'enzima sia da prodotto (glucosio) che da componenti solubili non volatili derivati dal pretrattamento [31,32].

L'inibizione da prodotto è superata nel materiale a S/L 10% trattato in pale cave a umido, dove il prodotto (glucosio) è trasformato in etanolo a partire dalle 72 ore in poi (Figura 20), consentendo agli enzimi di continuare l'idrolisi, aumentando la resa dal 78% al 91%.

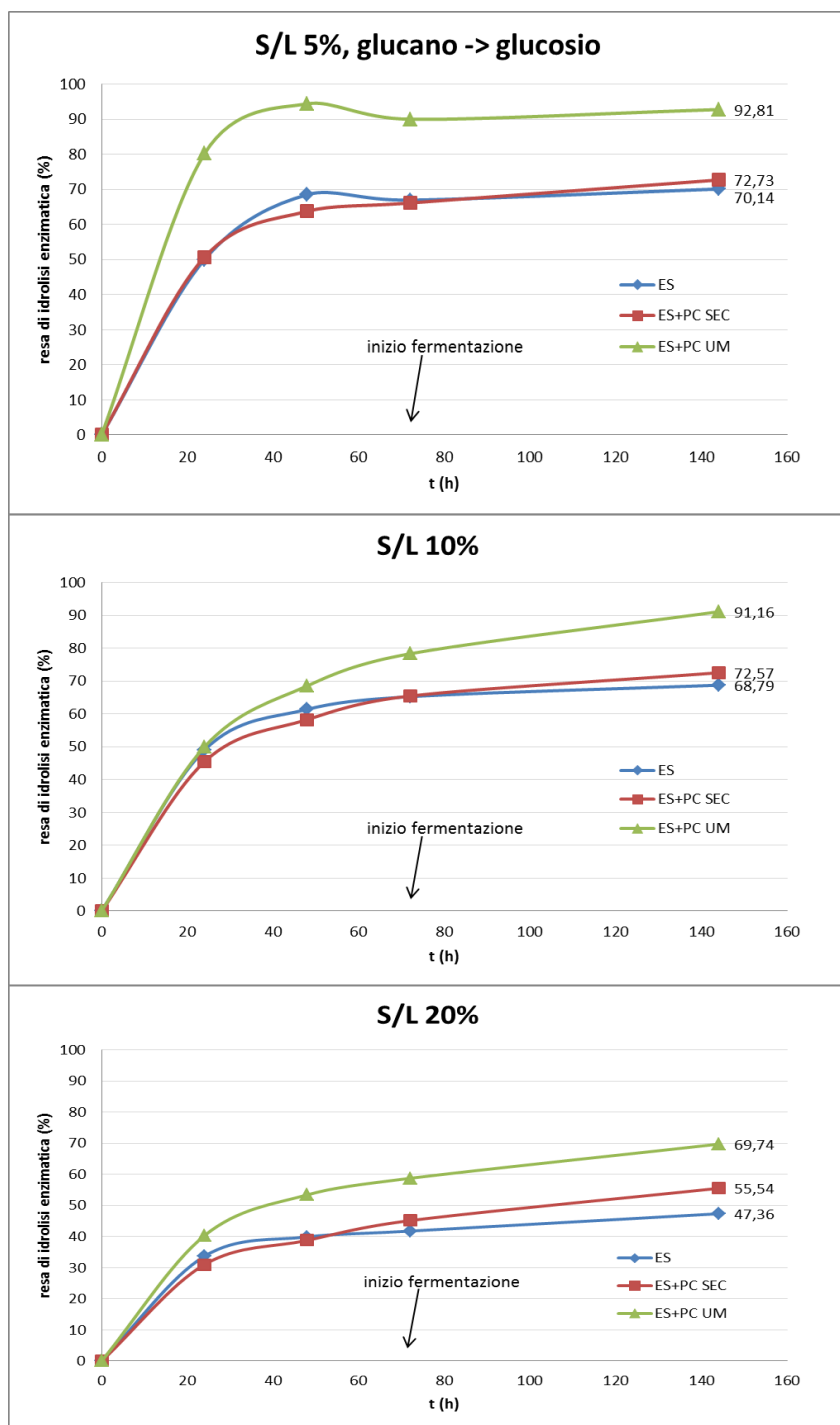


Figura 19: Rese di idrolisi enzimatica della cellulosa a differente trattamento (ES: nessun trattamento con pale cave, ES+PC SEC: trattamento con configurazione *a*, ES+PC UM: trattamento con configurazione *b*) e differente rapporto solido liquido S/L.

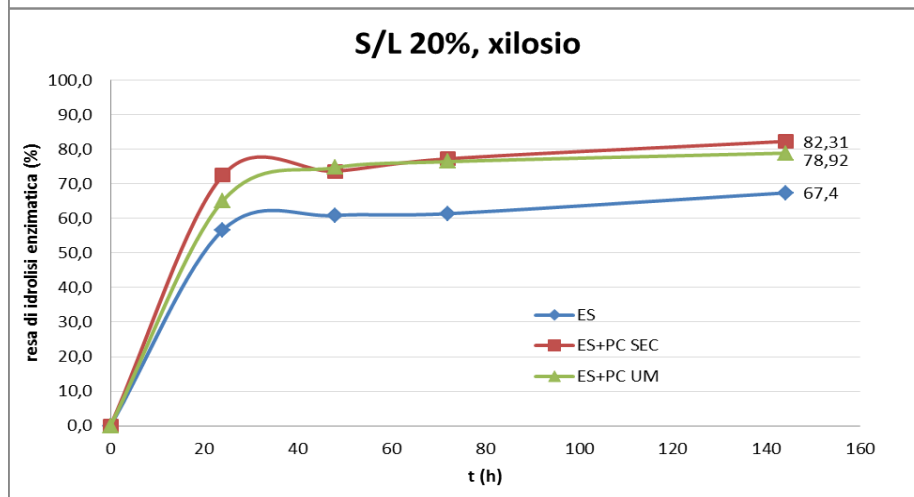
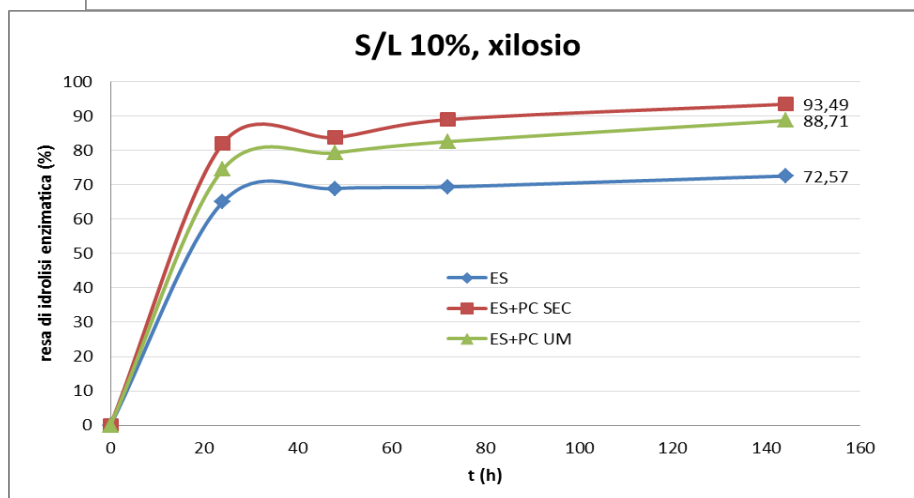
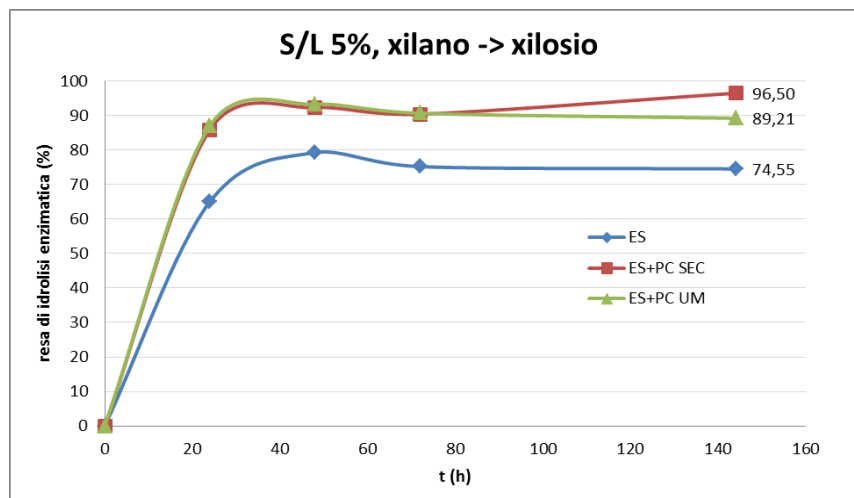


Figura 20: Rese di idrolisi enzimatica dell'emicellulosa a differente trattamento (ES: nessun trattamento con pale cave, ES+PC SEC: trattamento con configurazione *a*, ES+PC UM: trattamento con configurazione *b*) e differente rapporto S/L.

L'analisi dei brodi a fermentazione ultimata, ovvero dopo 72 ore dall'aggiunta dei lieviti agli idrolizzati (a loro volta ottenuti dopo 72 ore di idrolisi enzimatica), dimostra che il trattamento con pale cave produce un effetto detossificante (Figura 21).

Si premette che utilizzando l'esplosivo tal quale (ES) in nessun caso è stata evidenziata l'avvio della fermentazione.

La fermentazione alcolica avviene nei casi di trattamento a secco al 5% e trattamento a umido al 5% e 10%. Negli altri casi la fermentazione non parte, segno che la concentrazione degli inibitori è oltre la soglia di tolleranza del *Saccharomyces*, mentre ad alti rapporti solido/liquido, si osservano anche altri metaboliti come acido lattico e glicerolo, indice di altri ceppi microbici più adattabili. In tutti i casi, entro i margini degli errori sperimentali, sembra prodursi come metabolita anche acido acetico.

In pratica, quando il rapporto solido liquido è basso (5%), il metodo di detossificazione con le pale cave risulta efficiente, ottenendo ottime rese di fermentazione ($\geq 95\%$); Nel caso di trattamento a umido si ottengono rese più elevate di idrolisi e buone rese di fermentazione anche a rapporti solido liquido superiori (10%).

Le rese di etanolo prodotto, sia a partire dal quantitativo di zuccheri presenti, sia a partire dal contenuto di glucano nel substrato di partenza (quest'ultimo dato tiene conto anche della resa di idrolisi) sono riportati in Figura 22.

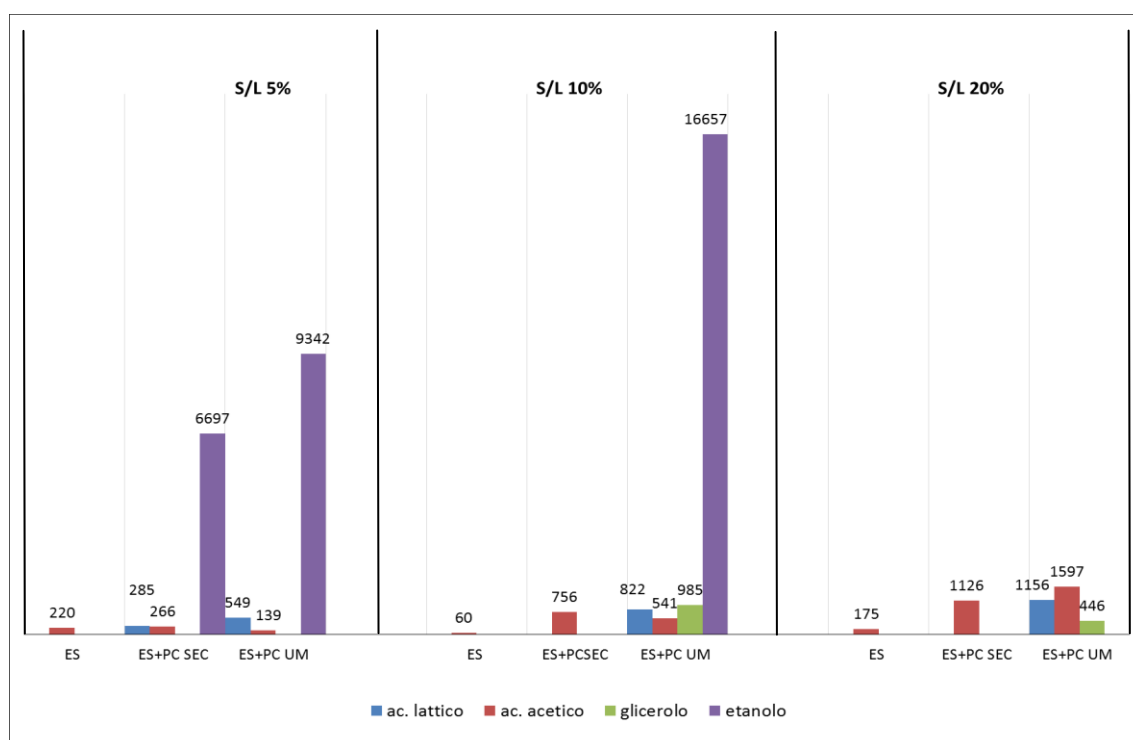


Figura 21: Prodotti di fermentazione alcolica dei materiali trattati e idrolizzati a differente rapporto solido/liquido (Figura 16). ES: nessun trattamento con pale cave,

ES+PC SEC: trattamento con configurazione *a*, ES+PC UM: trattamento con configurazione *b*.

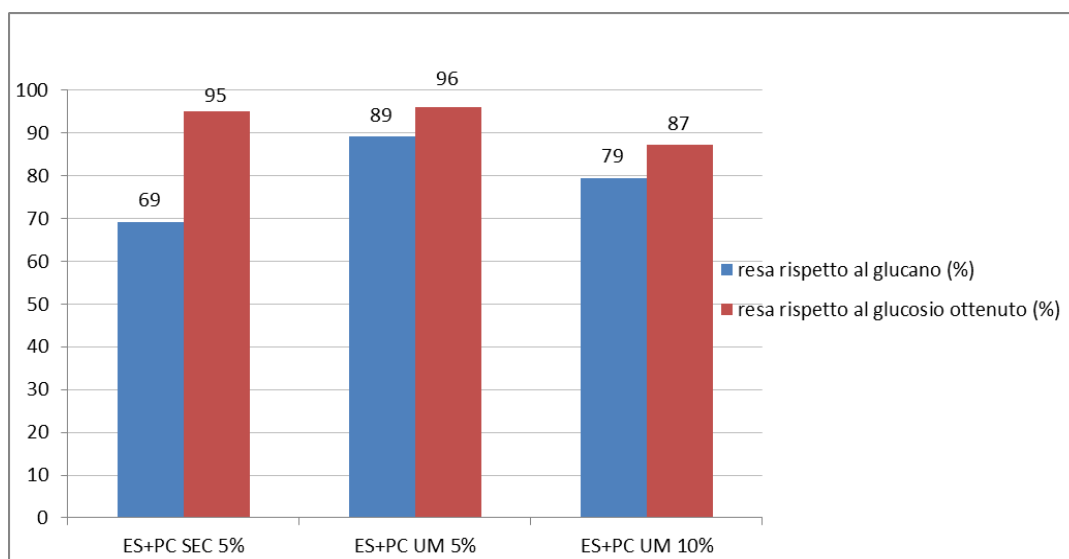


Figura 22: Rese di fermentazione alcolica nei materiali detossificati (vedi Figura 20). I dati in rosso si riferiscono alla sola trasformazione glucosio \rightarrow etanolo, mentre i dati in blu tengono conto della trasformazione glucano \rightarrow glucosio \rightarrow etanolo.

7.4 PROVE DI IDROLISI ENZIMATICA CONDOTTE NEL SISTEMA A PALE CAVE

Questi test hanno avuto lo scopo di verificare l'efficacia del sistema a pale cave nel migliorare l'idrolisi enzimatica quando sono impiegati elevati rapporti S/L.

Il macchinario non è stato usato per essiccare e rimuovere volatili da un solido come suo uso corrente, ma per miscelare una sospensione ad elevato contenuto di solido mantenendo costante la temperatura.

La prova è stata condotta ad un rapporto S/L pari al 40%. Questo valore è considerato il massimo utile, poiché, se tutta la cellulosa venisse idrolizzata, circa il 16% della fase liquida diventerebbe glucosio (essendo la cellulosa il 40% del solido) e se tutto il glucosio venisse fermentato allora circa l'8% del brodo diventerebbe etanolo, valore quest'ultimo prossimo al massimo ottenibile col *Saccharomyces* [14].

La prova di idrolisi è stata condotta per 24 ore in pale cave previa detossificazione del materiale a umido (configurazione *b*, 40 minuti). Dopo 24 ore, a liquefazione avvenuta (Figura 22), la sospensione è stata trasferita in beuta e l'idrolisi continuata per altre 48 ore; questa prova è indicata con la lettera D.

Parallelamente sono state allestite 3 prove di confronto, ovvero 3 idrolisi comparative, tutte in beuta, alle stesse condizioni di S/L 40%, temperatura, tempo, pH e dosaggio enzimatico.

In dettaglio: prova A, utilizzando esplosivo tal quale ES; prova B, utilizzando esplosivo detossificato in pale cave con la configurazione *a* (40 minuti) ES+PC SEC; prova C, utilizzando esplosivo detossificato in pale cave con la configurazione *b* (40 minuti) ES+PC UM.

Le rese di idrolisi enzimatiche dopo 72 ore sono riportate in Figura 23, dove si osserva un significativo miglioramento utilizzando le pale cave come pretrattamento all'idrolisi enzimatica. I risultati migliori sono stati ottenuti utilizzando il trattamento a umido dove rispetto all'esploso tal quale le rese sono quasi raddoppiate.

Se l'idrolisi è condotta direttamente nelle pale cave (prova D) si ottiene una rapida liquefazione (Figura 24) e, rispetto alla prova C in beuta, la resa migliora ulteriormente.

Tuttavia, a questi elevati livelli di solido in sospensione, le rese di conversione della cellulosa faticano a superare il 50% e ciò è dovuto ai limiti dell'enzima impiegato che è soggetto alla inibizione da prodotto (cellobiosio o glucosio) e dai derivati solubili di lignina.

Nelle Figure 25-30 sono riportate alcune foto delle prove sperimentali effettuate, in alcune delle quali sono mostrate anche le problematiche descritte nel testo.

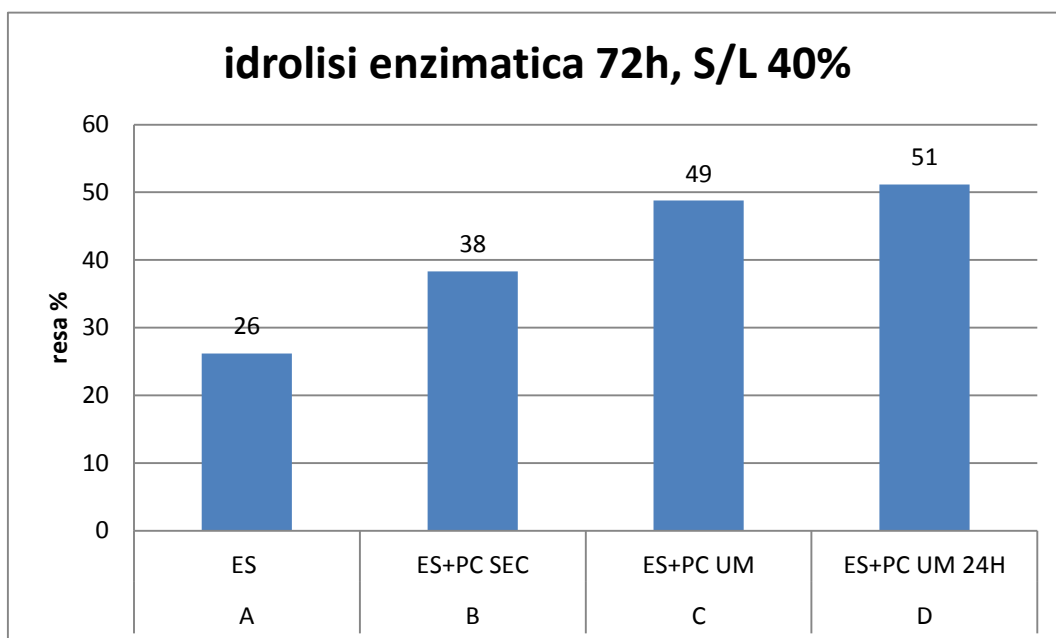


Figura 23: Rese di idrolisi enzimatica ad elevato rapporto solido liquido; A esploso tal quale; B esploso pretrattato in pale cave con sistema *a*; C esploso trattato con sistema *b*; D esploso trattato con sistema *b* e idrolizzato in pale cave per 24h.

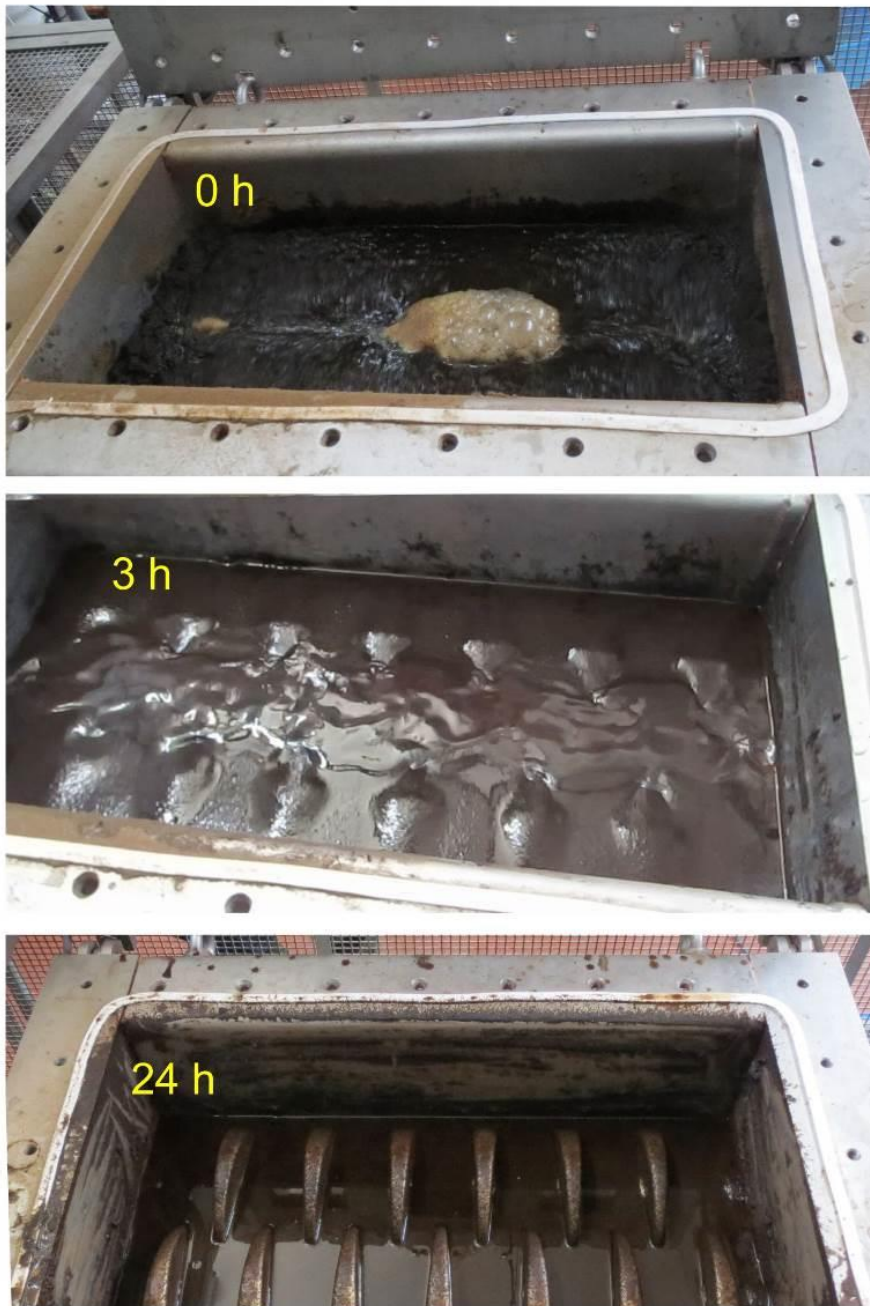


Figura 24: Idrolisi in pale cave ad elevato rapporto solido/liquido (40%); aspetto della sospensione all'inizio, dopo 3 ore e dopo 24 ore di idrolisi (liquefazione).



Figura 25: Aspetto del materiale esplosivo trattato con la configurazione *a*.

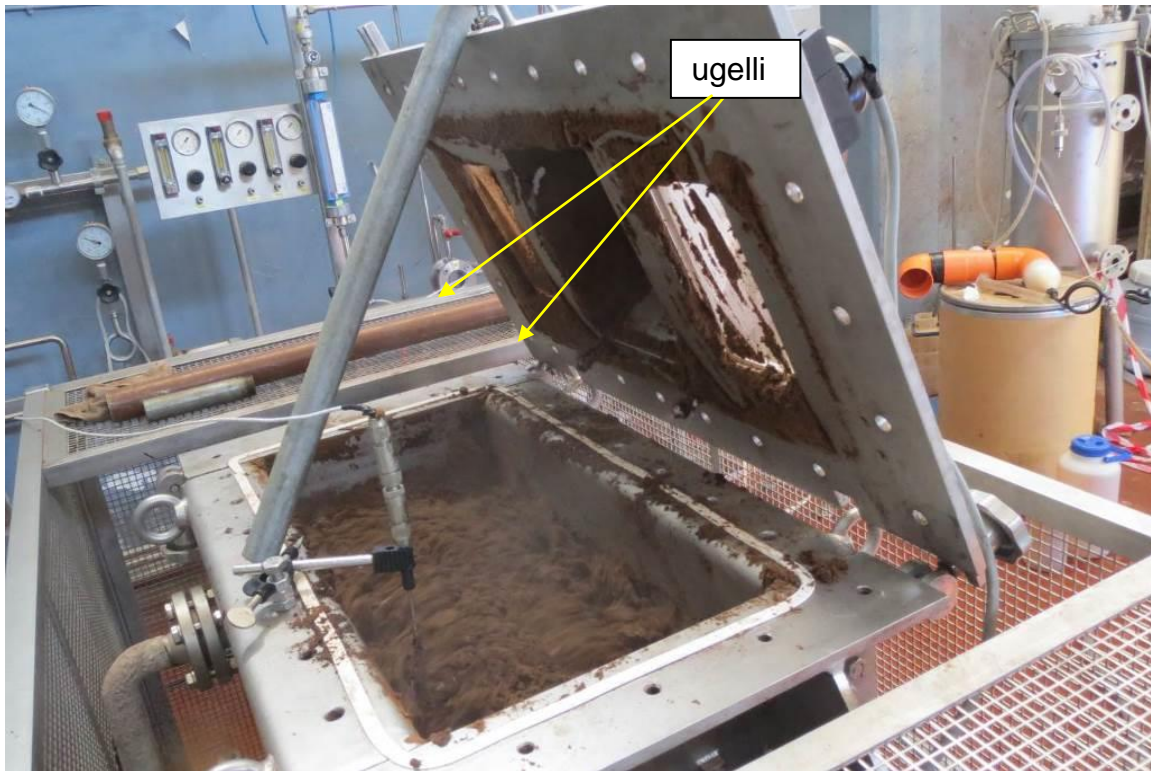


Figura 26: Ottenimento del materiale mediante la configurazione *b* (spray di acqua).



Figura 27: Assemblaggio del sistema per recupero dei condensati (conFigureazioni *c, d, e*)

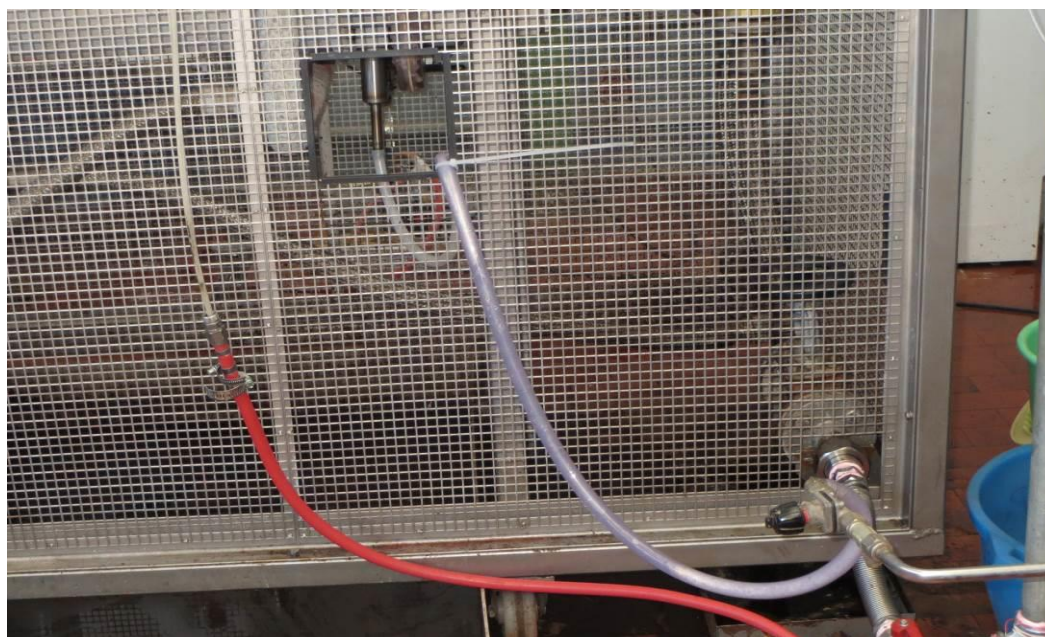


Figura 28: Particolare dell'iniettore di vapore, utilizzato nel sistema di configurazione *d*.

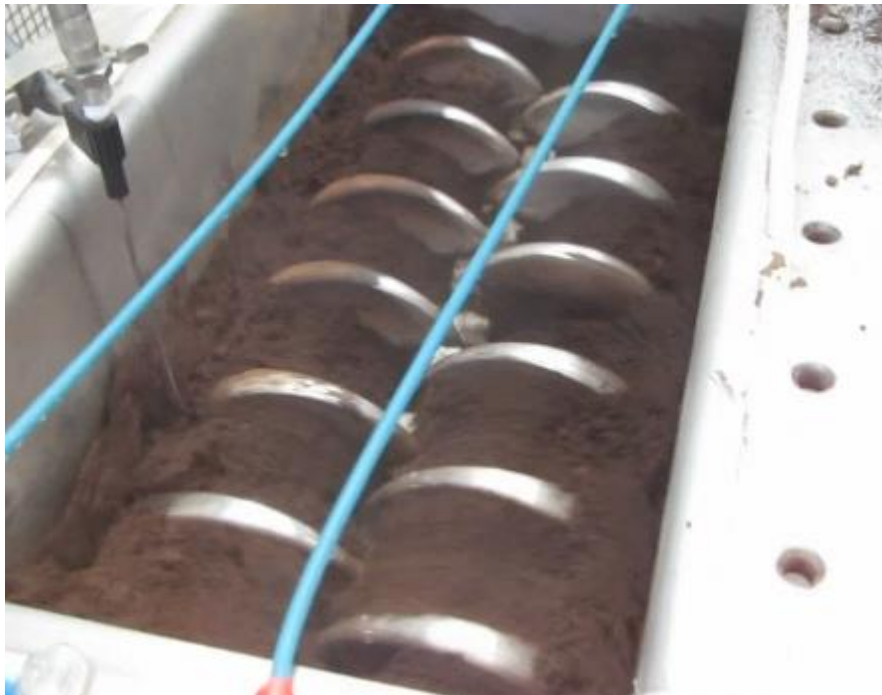


Figura 29: Sistema di umidificazione mediante tubi di gocciolamento, configurazione simile e alternativa a *b*, ma meno efficace.



Figura 30: Formazione di patina di esploso sulle pale cave: il fenomeno avviene per umidificazioni disomogenee su materiale fine e per tempi prolungati.

8. CONCLUSIONI

L'essiccatore a pale cave, un'apparecchiatura correntemente progettata e utilizzata industrialmente per altri scopi, può essere utilizzati:

- 1) Per pretrattare biomassa *steam exploded* ai fini della rimozione degli inibitori della fermentazione alcoolica;
- 2) Per miglioramento dell'idrolisi enzimatica ad alto carico di biomassa.

Il sistema è stato provato con paglia di grano a valle del trattamento a 210 °C, 6 minuti e in differenti configurazioni. Con un trattamento di 40-60 minuti a 65°C è stata conseguita una notevole rimozione dell'acido acetico (ridotto al 14% dell'iniziale) e una rimozione praticamente quantitativa del furfurale.

Umidificando l'esplosivo, durante il corso della detossificazione, la rimozione degli inibitori è più efficiente e il materiale ottenuto risulta più facilmente idrolizzabile da enzimi cellulastici.

Test di fermentazione su campioni così trattati hanno condotto a risultanze positive, avendo raggiunto rese di conversione della cellulosa in etanolo alcoolica del 95%.

Con il sistema a umidificazione il glucosio ottenibile dall'idrolisi è maggiore che nella configurazione "a secco" ed è possibile fermentare anche a rapporti solido/liquido del 10% con buone rese (87%).

Prove di idrolisi enzimatiche condotte direttamente nel sistema a pale cave con sospensioni ad elevato rapporto S/L (40%) hanno permesso di ottenere una buona liquefazione dello *slurry* fibroso già nella prima ora di trattamento.

9. RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i Sigg. Agnese Battafarano, Elio Alvino, Giuseppe Pinto per l'allestimento, la manutenzione dell'impianto e l'assistenza nell'esecuzione della sperimentazione.

10. BIBLIOGRAFIA

- [1] Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irimi Angelidaki. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 13, July 2010, Pages 4744–4753.
- [2] Ye Sun, Jiayang Cheng. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, Volume 83, Issue 1, May 2002, Pages 1–11.
- [3] Farid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irimi Angelidaki. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 13, July 2010, Pages 4744–4753.
- [4] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, M.J. Negro. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 13, July 2010, Pages 4851–4861.
- [5] Zimbardi Francesco, Ricci Esmeralda, Viola Egidio, Braccio Giacobbe. Etanolo da biomassa lignocellulosica. *Energia, ambiente e innovazione*, 2002, vol. 48, no5, pp. 25-32.
- [6] A.T.W.M. Hendriks, G. Zeeman. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, Volume 100, Issue 1, January 2009, Pages 10–18.
- [7] Jae-Won Lee, Ki-Seob Gwak, Jun-Yeong Park, Mi-Jin Park, Don-Ha Choi, Mi Kwon, and In-Gyu Choi. Biological Pretreatment of Softwood *Pinus densiflora* by Three White Rot Fungi. *The Journal of Microbiology*, Vol. 45, No. 6, December 2007, p. 485-491.
- [8] J.Y. Zhu, X.J. Pan, Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation, *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 13, July 2010, Pages 4992-5002.
- [9] P. Tomme, R.A.J. Warren, N.R. Gilkes. Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. *Advances in Microbial Physiology*, Volume 37, 1995, Pages 1–81.
- [10] J. Pérez, J. Muñoz-Dorado, T. de la Rubia, J. Martínez. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, June 2002, Volume 5, Issue 2, pp 53-63.
- [11] Pierre Béguin, Jean-Paul Aubert, The biological degradation of cellulose, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 13, Issue 1, January 1994, Pages 25-58.

- [12] L. T. Fan, Yong-Hyun Lee, David H. Beardmore. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 22, Issue 1, pages 177–199, January 1980.
- [13] Mustafa Balat, Havva Balat. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, Volume 86, Issue 11, November 2009, Pages 2273–2282.
- [14] Van Dijken JP; Weusthuis RA; Pronk JT, (1993) Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts, *Antonie Van Leeuwenhoek* 63(3-4), 343-52.
- [15] P. L. Rogers, K. J. Lee, M. L. Skotnicki, D. E. Tribe. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Advances in Biochemical Engineering*, Volume 23, 1982, pp 37-84
- [16] J.N Nigam. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipites*. *Journal of Biotechnology*, Volume 87, Issue 1, 27 April 2001, Pages 17–27.
- [17] M. Cantarella et al. Effect of Inhibitors Released during Steam-Explosion Treatment of Poplar Wood on Subsequent Enzymatic Hydrolysis and SSF. *Biotechnology Progress*, Volume 20, Issue 1, pages 200–206, 2004.
- [18] F. Zimbardi, D. Viggiano, F. Nanna, M. Demichele, D. Cuna, G. Cardinale. Steam explosion of straw in batch and continuous systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77–79 (1999), pp. 117–125.
- [19] I. Ballesteros, J. M. Oliva, A. A. Navarro, A. González, J. Carrasco, M. Ballesteros. Effect of Chip Size on Steam Explosion Pretreatment of Softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2000, pp 97-110.
- [20] Fairley P. Next generation biofuels. *Nature*, 2011;474:2–5.
- [21] Abatzoglou N., Chornet E., Belkacemi K. Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. *Chemical Engineering Science*, 1992;47:1109–22.
- [22] Olsson, L., and Hahn-Hagerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. (1996), *Enzyme and Microbial Technology* 18:312-331.
- [23] Hongqiang Li, Hongzhang Chen. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process Biochemistry*, Volume 43, Issue 12, December 2008, Pages 1447–1451.
- [24] Miguel Jurado, Alicia Prieto, Ángeles Martínez-Alcalá, Ángel T. Martínez, María Jesús Martínez. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation

- bioethanol. *Bioresource Technology*, Volume 100, Issue 24, December 2009, Pages 6378–6384.
- [25] Jing-Ping Ge, Bai-Yan Cai, Guo-Ming Liu, Hong-Zhi Ling, Bao-Zhu Fang, Gang Song, Xiao-Feng Yang and Wen-Xiang Ping. Comparison of different detoxification methods for corn cob hemicellulose hydrolysate to improve ethanol production by *Candida shehatae* ATCC 20335. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, Vol. 5(10), pp. 1163-1168.
- [26] Eva Palmqvist, Bärbel Hahn-Hägerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, Volume 74, Issue 1, August 2000, Pages 17–24.
- [27] Luo, Xiaolin, Zhu, Junyong. Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses. *Enzyme and microbial technology*, Vol. 48, no. 1 (Jan. 2011): p. 92-99.
- [28] Alfani F, Gallifuoco A, Saporosi A, Spera A, Cantarella M. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2000; 25:184–92.
- [29] Ando, S., Arai, I., Kiyoto, K., and Hanai, S. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influence on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation Technology*, 1986, 64, 567-570.
- [30] Eva Palmqvist, Bärbel Hahn-Hägerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, Volume 74, Issue 1, August 2000, Pages 25–33
- [31] George P. Philippidis, Tammy K. Smith, Charles E. Wyman. Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 41, Issue 9, pages 846–853, 15 April 1993.
- [32] E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, G. Zacchi. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 19 (1996), pp. 470–476.

Edito dall'ENEA
Servizio Promozione e Comunicazione
Lungotevere Thaon di Revel, 76 - 00196 Roma

www.enea.it

Pervenuto il 11.3.2016

Stampato presso il Laboratorio Tecnografico ENEA - C.R. Frascati

Finito di stampare nel mese di marzo 2016