



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
SCUOLA DI AGRARIA**

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

*Valutazione e selezione di residui agricoli ed agro-alimentari per la conversione in  
bioetanolo*

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa Marina Basaglia

Correlatore: Dott. Lorenzo Favaro

Laureanda: Daniela Cappello

Matricola n. 1081297

ANNO ACCADEMICO 2014 - 2015



# INDICE

LISTA ABBREVIAZIONI.....	5
RIASSUNTO.....	7
ABSTRACT.....	9
<b>1 INTRODUZIONE.....</b>	<b>11</b>
1.1 Un'importante risorsa energetica per il futuro: i biocarburanti.....	11
1.2 Il bioetanolo come fonte alternativa di carburante.....	12
1.3 I substrati alcoligeni.....	14
1.3.1 Le tre sezioni delle materie prime impiegate per la conversione in bioetanolo.....	16
1.4 Le fasi di produzione del bioetanolo.....	18
1.4.1 Il pretrattamento dei substrati lignocellulosici.....	19
1.4.1.1 Il trattamento enzimatico della biomassa.....	21
1.4.2 La fermentazione alcolica.....	22
1.4.3 La distillazione: ultima fase del processo produttivo.....	23
1.5 Una conseguenza della fase di pretrattamento: la formazione di inibitori.....	23
1.6 Soluzioni tecniche per la produzione di bioetanolo di seconda generazione.....	26
1.6.1 Il modello CBP (Consolidated BioProcessing) come il sistema produttivo più vantaggioso.....	28
1.7 Il Progetto BioRivaluta.....	30
<b>2 SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>34</b>
<b>3 MATERIALI E METODI.....</b>	<b>35</b>
3.1 Mezzi colturali di crescita.....	35
3.2 Ceppo microbico e condizioni di crescita.....	35
3.3 Determinazione della composizione qualitativa di scarti e residui agroindustriali.....	36
3.4 Trattamento con enzimi commerciali per la saccarificazione delle biomasse lignocellulosiche.....	38
3.4.1 Determinazione dell'attività enzimatica degli enzimi commerciali.....	40
3.5 Saccarificazione dei substrati lignocellulosici tramite enzimi commerciali.....	40

3.6	Prove di pretrattamento e saccarificazione sulle biomasse lignocellulosiche.....	41
3.7	Prove di fermentazione di substrati prevalentemente zuccherini.....	43
<b>4</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>45</b>
4.1	Analisi dei principali componenti strutturali degli scarti e residui agroindustriali censiti nel corso del Progetto BioRivaluta.....	45
4.2	Disponibilità quantitativa di alcuni substrati lignocellulosici e zuccherini nell'ambito dell'aerale di BioRivaluta.....	63
4.3	Prove di saccarificazione sulle biomasse lignocellulosiche selezionate.....	66
4.4	Prove di pretrattamento e saccarificazione su substrati lignocellulosici.....	75
4.4.1	Gli inibitori prodotti durante la fase di pretrattamento.....	81
4.5	Fermentazione di substrati zuccherini.....	83
<b>5</b>	<b>CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....</b>	<b>91</b>

## LISTA DI ABBREVIAZIONI

AFEX	Ammonia fiber explosion
CBP	Consolidated BioProcessing
CM	Contenuto Medio
CMC	CarbossiMetilCellulosa
CMCasi	CarbossiMetilCellulasi
DAFNAE	Department of Agronomy Food Natural resources Animals and Environment
DDGS	Distiller Dried Grains with Soluble
DNS	DiNitroSalicilico
FBG	Fungal $\beta$ -Glucanase
FORSU	Frazione Organica dei Rifiuti Solidi Urbani
GRAS	Generally Regarded As Safe
GS	Grado di Saccarificazione
HMF	5-IdrossiMetil-2-Furaldeide
HPAEC-PAD	High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEA	International Energy Agency
MFC	Mezzo Fermentazione di Controllo
MPV	Massima Produttività Volumetrica in etanolo
ND	Non Disponibile

NR	Non Rilevato
PV	Produttività volumetrica in etanolo
PSR	Piano di Sviluppo Regionale
SHF	Separated Hydrolysis and Fermentation
SSCF	Simultaneous Saccharification and CoFermentation
SSF	Simultaneous Saccharification and Fermentation
YNB	Yeast Nitrogen Base without amino acids
YPD	Yeast Peptone Dextrose

## RIASSUNTO

Il bioetanolo rappresenta l'alternativa più promettente e interessante da utilizzare in sostituzione dei carburanti derivati dalla raffinazione del petrolio. In particolare, il bioetanolo di seconda generazione risulta essere un'opportunità ai fini economici, ecologici ed etici, dal momento che le biomasse impiegate nella conversione in bioetanolo sono materiali di scarto o residuali provenienti dall'attività agricola e dall'industria di trasformazione delle derrate alimentari. L'impiego di tali risorse potrebbe quindi risolvere problemi quali lo smaltimento dei rifiuti, l'elevato costo delle materie prime, la competizione con le colture alimentari.

In questa prospettiva, la produzione di bioetanolo da biomasse residuali varie ed eterogenee è indubbiamente interessante. Infatti, questo lavoro di tesi, che si inserisce nell'ambito del Progetto BioRivaluta finanziato dalla regione Veneto, ha lo scopo di analizzare e valutare le potenzialità di conversione di differenti sottoprodotti agroalimentari in bioetanolo. Prendendo come sistema modello la provincia di Verona, è stata proposta e realizzata una capillare indagine cognitiva della disponibilità di materiali organici a basso costo risultanti dall'attività agricola-forestali e/o dall'industria di trasformazione delle derrate alimentari.

Al fine di individuare l'effettiva potenzialità per la trasformazione delle singole matrici in etanolo o per eventuali ulteriori valorizzazioni energetiche, in primo luogo sono state condotte sui 52 substrati censiti analisi per la determinazione degli zuccheri semplici solubili e per la composizione in cellulosa, emicellulosa, lignina, amido, proteina, ceneri e sostanza secca.

Nella seconda parte di questo lavoro, alcuni campioni, selezionati in base ai volumi di biomasse disponibili e alla composizione delle singole matrici, sono stati sottoposti a diverse prove di saccarificazione con e senza pretrattamento usando complessi enzimatici commerciali (NS50012 e AlternaFuel CMAX) per determinare in modo accurato il quantitativo di zuccheri semplici ottenibile da polisaccaridi come cellulosa ed emicellulosa.

Considerando la recalcitranza della biomassa lignocellulosica al processo di idrolisi enzimatica, sono state eseguite delle prove di pretrattamento con acido solforico a diverse concentrazioni e in condizioni *mild* con l'obiettivo di ottenere una maggiore resa di saccarificazione.

Allo scopo di valutare il potenziale di etanolo di alcuni substrati prevalentemente zuccherini, selezionati in base al loro elevato contenuto in zuccheri fermentescibili, sono state eseguite delle prove di fermentazione utilizzando il ceppo di lievito industriale *S. cerevisiae* MEL2, che ha dimostrato elevate *performances* fermentative.

Il presente lavoro di tesi ha consentito di evidenziare che la regione Veneto, perlomeno nel territorio preso in considerazione, dispone di un grande quantitativo di sottoprodotti e matrici residuali del settore agroalimentare con elevate potenzialità di conversione in etanolo. Prossimi obiettivi della ricerca saranno la definizione di nuove soluzioni per aumentare le rese di saccarificazione dei substrati lignocellulosici più interessanti, quali tralci di vite e potature di olivo. Inoltre ulteriori studi verranno dedicati alla selezione e/o ingegnerizzazione di microrganismi in grado di idrolizzare contemporaneamente amido e cellulosa e di fermentare gli zuccheri pentosi ottenuti dalla degradazione dell'emicellulosa al fine di aumentare la resa finale in etanolo.

## ABSTRACT

Bioethanol is the most promising and attractive alternative to use as replacement of fossil fuels. The second-generation bioethanol appears to be an economic, ecological and ethical opportunity, since the biomasses used as feedstock are residual waste materials from agricultural sector and food industries. The employment of these resources could solve problems concerning waste disposal, high cost of raw materials and competition with food crops.

In this perspective, the production of bioethanol from heterogeneous residues are definitely interesting. This thesis, which is in the frame of the BioRivaluta Project supported by Veneto Region, aims to analyze and evaluate the conversion potential of different agricultural and food by-products into bioethanol. Taking into consideration Verona territory as a model system, a detailed investigation has been carried out on the availability of low cost organic materials deriving from agri-forestry and agri-food industries.

To assess the ethanol potential of each by-product and waste, fifty-two substrates collected from several food processing plants and agricultural farms were analysed. Specifically, simple sugars content was determined together with their amounts of cellulose, hemicellulose, lignin, starch, protein, ash and dry matter.

In the second part of this work, some samples, selected according to both their composition in terms of sugars and polysaccharides suitable for ethanol conversion and their quantitative availability, were subjected to different saccharification tests, with and without pre-treatment. Commercial enzyme complexes (NS50012 and AlternaFuel CMAX) were used to determine the amount of simple sugars obtainable from the hydrolysis of polysaccharides such as cellulose and hemicellulose.

Considering that the lignocellulosic biomass hinder the enzymatic hydrolysis, pre-treatment experiments were performed using different concentration of sulfuric acid at mild conditions in order to obtain higher yields of saccharification.

Moreover, to evaluate the ethanol potential of few substrates, selected on the basis of their high content of fermentable sugars, fermentation kinetics were conducted using an industrial yeast (*S. cerevisiae* MEL2), which previously showed high fermentative performances.

This project allowed to point out that the Veneto Region (at least in the area taken into consideration) has a large amount of by-products and residual matrices from agri-food industries, which are characterized by high ethanol conversion potential. Upcoming objectives will be to define new solutions to increase yields of saccharification of lignocellulosic substrates, such as grape and olive pruning residues. Moreover, further investigations will be dedicated to the selection and/or engineering of microorganisms able to hydrolyse both starch and cellulose. These microorganisms should be also able to ferment pentose sugars obtained from hemicellulose hydrolysis in order to increase the overall ethanol yield.

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Un'importante risorsa energetica per il futuro: i biocarburanti

Il rapido sviluppo della civiltà attuale ha prodotto un aumento della domanda di petrolio; il conseguente calo delle riserve di carburante fossile hanno portato alla ricerca di fonti alternative di energia e materie prime; tra queste, i biocarburanti hanno attratto l'attenzione della comunità scientifica.

Un'evoluzione recente dell'agroindustria, che promette di rivoluzionare il mercato agricolo e che sta cambiando la geopolitica dell'energia, è sicuramente la produzione di energia partendo da biomasse (Pietrobelli *and* Pugliese, 2007). Secondo il Decreto Legislativo 387/2003 nell'articolo 2, la biomassa è *“la parte biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui provenienti dall'agricoltura (comprendente sostanze vegetali ed animali) e dalla silvicoltura e dalle industrie connesse, nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali ed urbani”*. Quindi, con il termine biomassa si indica una gran quantità di materiali di natura estremamente eterogenea e di origine non fossile e che possono essere usati come combustibili per la produzione di energia. Infatti per biocarburanti si intendono *“carburanti liquidi o gassosi per i trasporti ricavati da biomassa”* (Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio, 2009); possono essere di prima generazione, ovvero prodotti a partire da colture alimentari, o di seconda generazione, ossia prodotti da materie prime non edibili o prodotti di scarto come i numerosi residui lignocellulosici del settore agro-industriale (Sweeney *and* Xu, 2012). Tra i biocarburanti di prima generazione, il bioetanolo è per la maggior parte prodotto a partire da zuccheri o amido.

L'obiettivo europeo nei confronti dei biocarburanti o *biofuels* è a) produrre entro il 2020 il 20% di energia da fonti rinnovabili sul consumo totale di energia prodotta e b) una riduzione del 20% delle emissioni di gas serra rispetto al 1990 (Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio, 2009; EU Biofuels Annual, 2013). La Commissione europea ha stabilito tali obiettivi basandosi sulla situazione energetica contemporanea e sul potenziale di crescita nei diversi Stati membri.

Quindi carburanti prodotti a partire da fonti alternative non di origine fossile e da substrati a basso costo, come il bioetanolo, si distinguono dal carburante fossile tradizionale perchè

sono in grado di diminuire l'emissione di biossido di carbonio, che è la principale causa di inquinamento ambientale, e di ridurre la dipendenza dal petrolio.

## **1.2 Il bioetanolo come fonte alternativa di carburante**

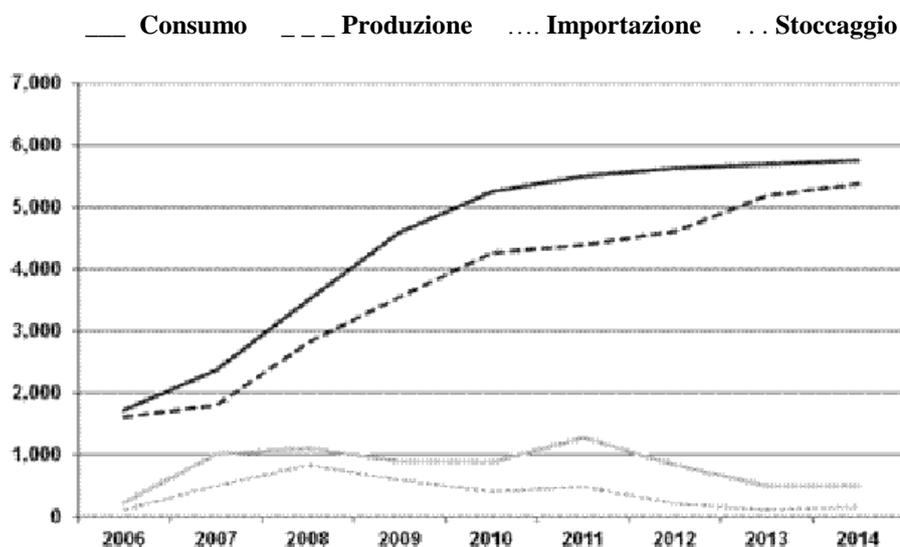
Il bioetanolo è il *biofuels* più utilizzato e diffuso al mondo, nonostante ne esistano di diverse tipologie come biodiesel, oli vegetali, biogas. Le prospettive in tutto il mondo sono quelle di espandere la produzione di etanolo e il suo consumo (Mussatto *et al.*, 2010) (Figura 1.1).

Secondo la Direttiva 30/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio dell'UE nell'articolo 2, il bioetanolo è "*etanolo ricavato dalla biomassa e/o dalla parte biodegradabile dei rifiuti, destinato ad essere usato come biocarburante*". Le caratteristiche fisico-chimiche dell'etanolo, detto anche alcol etilico o alcool, sono le seguenti: liquido, incolore, infiammabile e volatile. Si ottiene tramite fermentazione alcolica ad opera di microrganismi che utilizzano gli zuccheri presenti nella biomassa. Il prodotto finale, dopo distillazione, ha un contenuto alcolico che varia dall' 80% al 99,9% e un elevato contenuto energetico (27 MJ/Kg).

L'etanolo è molto versatile e può essere utilizzato in una vasta gamma di prodotti come prodotti farmaceutici, prodotti cosmetici, prodotti chimici verdi, prodotti industriali (solventi, vernici), bevande, materie plastiche, ed è sempre più diffuso come carburante rinnovabile per autotrazione. Una delle tante caratteristiche positive che ha l'impiego del bioetanolo come carburante alternativo, è il suo potere antidetonante, espresso dal numero di ottano, che lo rende superiore a quello della benzina permettendo un risparmio nell'acquisto degli antidetonanti. Il bioetanolo, avendo un comportamento simile alla benzina, può essere usato per sostituirla nell'alimentazione dei motori a ciclo otto. Attualmente in Europa, questo biocarburante viene miscelato alla benzina in quantità pari al 5% (E5) senza causare problemi alle auto, mentre negli Stati Uniti e in Canada la percentuale è estesa al 20%. Quasi tutte le automobili prodotte dopo il 2000, possono consumare benzina miscelata con etanolo fino ad un massimo del 10% (E10).

L'utilizzo di bioetanolo in sostituzione ai comuni carburanti fossili porta ad una riduzione di emissioni nell'atmosfera di gas serra e di composti inquinanti quali anidride solforosa,

monossido di carbonio e particolato. Oggigiorno, gli Stati Uniti sono i maggiori produttori di bioetanolo a livello mondiale, infatti è stato stimato che nel 2013 la loro produzione sia stata di 50,4 milioni di litri. Gli altri Stati che hanno registrato una produzione considerevole di bioetanolo sono il Brasile con 23,7 milioni di litri e l'Europa con 5,2 milioni di litri (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Evoluzione del consumo e della produzione europea di bioetanolo nel periodo compreso tra il 2006 e il 2014 (EU Biofuels Annual, 2013).

Ad oggi, l'etanolo viene principalmente prodotto a partire da amido di mais (vedi capitolo 1.3.1). L'utilizzo di questa risorsa alimentare ha fatto sorgere numerosi dubbi sull'eticità di questo processo che sottrarrebbe alimenti al consumo umano. Tra l'altro l'incremento della produzione di biocarburanti di prima generazione, ha portato all'aumento di prezzi nel settore alimentare (Laursen, 2006) proprio per via delle materie prime che questi hanno in comune. La comunità scientifica ha pertanto ritenuto necessario orientare la ricerca verso nuove soluzioni atte ad evitare l'utilizzo di fonti alimentari, in favore di materiali di scarto provenienti dalle produzioni alimentari (residui agroindustriali, esuberi/scarti di prodotti agricoli, eccedenze alimentari) o quelli provenienti da colture dedicate a basso costo e non alimentari (in genere provenienti da terreni marginali). La fermentazione di questi prodotti

porta alla produzione del cosiddetto bioetanolo di seconda generazione (Thygesen *et al.*, 2012).

I substrati da cui ricavare etanolo di seconda generazione e su cui sono prevalentemente indirizzati gli studi sono essenzialmente quelli lignocellulosici, perché sono disponibili in quantità maggiori, non sono destinati al consumo alimentare e sono a basso costo. Tuttavia, al momento la produzione di questi biocarburanti di seconda generazione non è conveniente a livello economico perché bisogna superare numerose barriere tecniche prima di riuscire a sfruttare il loro potenziale (Eisberg, 2006).

### **1.3 I substrati alcoligeni**

Le colture alcoligene sono coltivate al fine di ottenere prodotti agricoli con elevato contenuto in carboidrati da introdurre nella filiera del bioetanolo. Queste colture possono essere la barbabietola da zucchero, la canna da zucchero o sorgo zuccherino (colture saccarifere) o cereali, in particolare frumento tenero e mais (amidacee) (vedi in seguito) e costituiscono il substrato di fermentazione per la produzione di bioetanolo di prima generazione.

Anche gli scarti della produzione ortofrutticola possono essere utilizzati per la produzione di alcol, sfruttando le stesse tecnologie impiegate per le materie prime derivanti dalle colture dedicate saccarifere e amidacee. I più comuni residui agro-alimentari che oggi si convertono in bioetanolo sono: gli scarti della produzione del vino, il melasso (sottoprodotto della filiera dello zucchero) e la fermentazione delle eccedenze di frutta.

La filiera produttiva del bioetanolo di seconda generazione, le cui materie prime sono composte da residui lignocellulosici, è in fase di ottimizzazione. Le prove sperimentali condotte a tal scopo mirano a migliorare soprattutto le prime fasi della filiera (come il pretrattamento).

Al giorno d'oggi in Italia, le colture alcoligene lignocellulosiche più indicate sono il sorgo da fibra, il panico e la canna comune, ma anche le biomasse residuali come i residui agroforestali e la frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU). Nell'UE, il bioetanolo è in gran parte prodotto dai derivati delle produzioni di barbabietola da zucchero, grano, mais,

segale e orzo. In particolare, l'Europa nord-occidentale utilizza il grano, mentre l'Europa centrale e la Spagna utilizzano prevalentemente il mais. Secondo EU Biofuels Annual (2013), in Italia circa il 30% del bioetanolo viene prodotto a partire da sottoprodotti del vino e circa il 10% direttamente dal vino.

E' necessario sottolineare che uno dei principali costi per la produzione di etanolo rimane sempre il substrato a causa della concorrenza con il settore alimentare e dell'elevato costo di approvvigionamento. Difatti, l'IEA (International Energy Agency, 2010) preannuncia che in futuro sarà richiesto di produrre etanolo da substrati economici quali ad esempio colture-energetiche, scarti dell'industria alimentare e residui agroforestali. Nella Tabella 1.1 a titolo di esempio, sono indicati una serie di sottoprodotti agricoli disponibili in Italia.

<b>Residuo colturale</b>	<b>Produzione media (t/ha)</b>
Paglia di frumento tenero	3-6
Paglia di frumento duro	3-5
Paglia di altri cereali autunno-vernini	3-5,5
Paglia di riso	3-5
Stocchi di mais	4,5-6
Tutoli e brattee di mais	1,5-2,5
Sarmenti di vite	3-4
Frasche di ulivo	1-2,5
Residui di fruttiferi	2-3

**Tabella 1.1** Livelli di produzione degli scarti agricoli in Italia per ettaro.

Se produrre bioetanolo partendo da scarti delle attività agricole si consoliderà su scala commerciale, certamente provocherà un impatto positivo nell'ambiente e un vantaggio in termini di costo/beneficio. Queste brevi considerazioni mettono in evidenza il bisogno di trovare una fonte alternativa ai carburanti fossili che sia in grado di ridurre l'impatto

ambientale dovuto al loro utilizzo (per esempio, diminuire le emissioni di gas ad effetto serra), che sia disponibile nelle quantità richieste e tale che le tecnologie sviluppate per la produzione di biocarburanti siano anche eco-sostenibili.

### **1.3.1 Le tre sezioni delle materie prime impiegate per la conversione in bioetanolo**

Dal momento che le materie prime utilizzate per la conversione in bioetanolo risultano così eterogenee, come anticipato sopra, queste sono state suddivise in tre sezioni: saccarifera, amidacea e lignocellulosica. Ciascuna sezione si distingue nella prima fase della filiera produttiva mentre le ultime fasi sono uguali per tutte (fermentazione, distillazione e disidratazione).

**Sezione saccarifera:** Le materie prime, incluse in questa sezione, contengono zuccheri già in forma fermentescibile (glucosio, fruttosio e saccarosio) che a differenza delle altre sezioni consentono di utilizzare un processo semplice per la produzione di bioetanolo. A questa sezione appartengono la barbabietola e il sorgo zuccherino.

Per prima cosa bisogna estrarre gli zuccheri dal substrato; al termine dell'estrazione si procede con la fermentazione del succo zuccherino; questa fase è valida per le colture saccarifere dedicate e non per la valorizzazione delle biomasse residuali.

Il 18% in peso come sostanza secca degli zuccheri accumulati dalla barbabietola si trovano nella radice fittonante. Infatti, gli zuccheri vengono estratti previa riduzione a fette della radice fittonante ad una temperatura di 70-80°C per diffusione nel succo zuccherino diluito o in soluzione acquosa. La polpa, sottoprodotto dell'estrazione, può essere destinata all'alimentazione zootecnica solo dopo averla essiccata.

A differenza della barbabietola, il sorgo zuccherino è raccolto allo stadio in cui gli zuccheri risultano accumulati nei tessuti dello stelo quando raggiunge una percentuale dell'11% in peso come sostanza secca. L'insilamento è una delle diverse strategie considerate come tecnica di conservazione per il fatto che la biomassa raccolta ha un'elevata fermentescibilità. Questo metodo fa sì che avvenga la parziale degradazione dei composti polisaccaridici (amido, cellulosa, emicellulosa) presenti insieme agli zuccheri semplici. Alla fine di questo processo si procede con l'estrazione degli zuccheri dalla biomassa. Il bagasso,

che è il sottoprodotto della lavorazione del sorgo zuccherino, può essere recuperato per la produzione di energia termica (previa essiccazione) o destinato alla fertilizzazione dei terreni.

**Sezione amidacea:** Questa sezione è associata in modo particolare all'amido ricavato dalla granella di mais. In questo caso, l'obiettivo delle prime fasi di filiera è di ottimizzare la conversione dell'amido contenuto nella granella in zuccheri fermentescibili tramite idrolisi enzimatica.

Innanzitutto è necessario ridurre la granulometria della biomassa macinando la granella per riuscire a massimizzare la resa nella fase d'idrolisi enzimatica. La macinazione può essere eseguita in due modi diversi:

1. macinazione per via umida: la granella è pretrattata con  $\text{SO}_3$  allo 0,1-0,2% in peso ad una temperatura di  $50^\circ\text{C}$  per 24-28 ore. Questo trattamento separa l'amido dalle altre componenti ottenendo una sua elevata purezza. Tale processo richiede costi energetici elevati;
2. macinazione per via secca: la granella viene tritata meccanicamente e poi miscelata con acqua. A fine trattamento si ottiene un sottoprodotto di qualità superiore alla tecnica precedente.

Di solito, il residuo della distillazione (lieviti e zuccheri) viene mescolato a quello della fase di macinazione per formare DDGS (*Distiller Dried Grains with Soluble*) destinato all'alimentazione zootecnica.

La fase di idrolisi dell'amido è la fase successiva alla macinazione. Le catene dell'amido sono ridotte a zuccheri fermentescibili mediante l'azione enzimatica delle idrolasi, un processo che avviene in due passaggi: *liquefazione* e *saccarificazione*. La prima fase determina la rottura e la perdita della struttura granulare dell'amido attraverso l'applicazione di enzimi  $\alpha$ -amilasi. In particolare, l' $\alpha$ -amilasi agisce a random sui legami  $\alpha$ -1,4 della struttura amidacea. Successivamente, la fase di *saccarificazione* rompe i legami ramificati dell'amido ( $\alpha$ -1,6), usufruendo delle glucoamilasi, con liberazione degli zuccheri fermentescibili (principalmente glucosio).

Al termine di queste due fasi si procede con la fermentazione alcolica.

Le colture più idonee alle condizioni pedo-climatiche italiane sono la barbabietola da zucchero e il sorgo zuccherino per quanto riguarda le saccarifere ed il mais (specie nell'Italia settentrionale) e il frumento tenero (in particolare nell'Italia meridionale) per quanto concerne le amidacee.

**Sezione lignocellulosica:** Siccome la richiesta di etanolo è in crescita, è diventato di fondamentale importanza selezionare quelle materie prime che siano sostenibili e convertibili in tutte le loro componenti, compresi i residui lignocellulosici.

Da questo punto di vista la biomassa lignocellulosica risulta il materiale grezzo più promettente per la produzione di bioetanolo. Anche se rispetto al materiale ricco in amido, queste biomasse richiedono elevate dosi di enzimi commerciali e costosi pretrattamenti, i costi sono tali che persino la loro grande disponibilità e prezzo contenuto non sono sufficienti a diminuirne i costi produttivi. Per questi motivi è necessario valutare attentamente il rapporto costi/benefici. Inoltre, l'emicellulosa e la cellulosa, componenti della parete cellulare dei vegetali, convertibili in etanolo, sono rigidamente strutturate con la lignina (componente non fermentescibile). Per di più, gli zuccheri semplici, liberati durante il corso della degradazione dell'emicellulosa (arabinosio, xilosio, mannosio), risultano essere difficilmente fermentescibili dai microrganismi generalmente utilizzati nei processi fermentativi (*Saccharomyces cerevisiae*) ed è necessaria una complessa fase di perfezionamento del processo usando altri microrganismi che difficilmente hanno la stessa capacità di fermentare gli zuccheri di *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **1.4 Le fasi di produzione del bioetanolo**

Normalmente la produzione di bioetanolo segue tre *steps* (Mussatto *et al*, 2010):

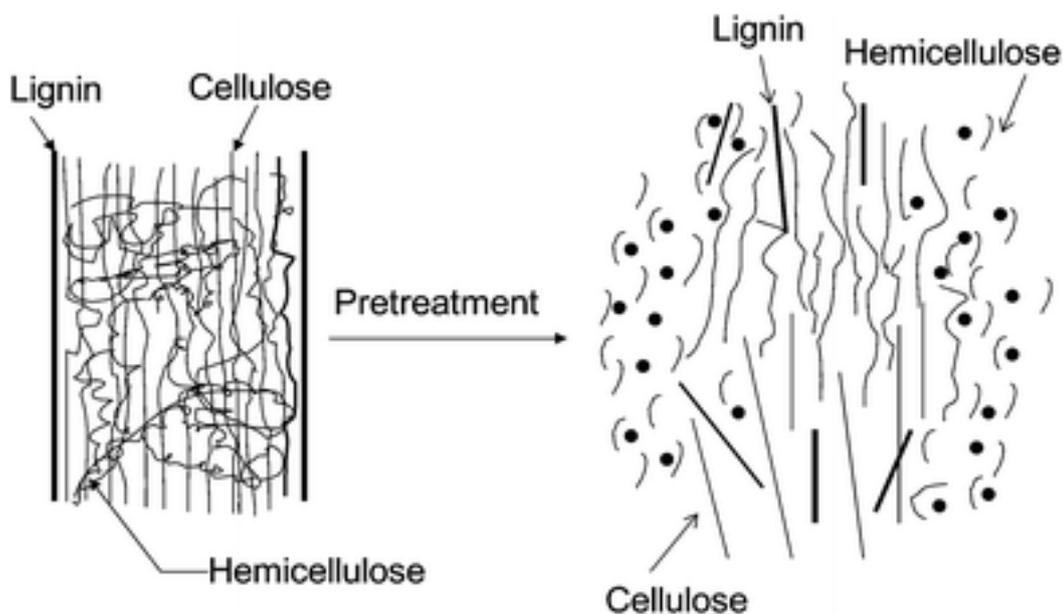
1. l'ottenimento di una soluzione di zuccheri fermentescibili dal substrato di partenza,
2. la fermentazione degli zuccheri in etanolo,
3. la separazione e purificazione dell'etanolo attraverso la distillazione e la disidratazione.

Tuttavia una nuova fase viene aggiunta al processo produttivo nel caso di materiali lignocellulosici, poiché per idrolizzare anche la frazione emicellulosa-cellulosa di un *feedstock* bisogna pretrattare (come ampiamente descritto nei capitoli precedenti). Come già sopra accennato questa fase consiste in un pretrattamento che sia in grado di destrutturare la biomassa lignocellulosica migliorando l'accessibilità degli enzimi ai polisaccaridi e liberando così un maggior contenuto di zuccheri fermentabili in etanolo.

Ad esempio, nel caso dei tralci di vite se si vuole produrre etanolo in quantità significative, è ipotizzabile sia necessario utilizzare pretrattamenti chimici, fisici o enzimatici per ottenere zuccheri fermentescibili in una fase successiva.

#### 1.4.1 Il pretrattamento dei substrati lignocellulosici

Dunque, il pretrattamento è il problema principale nell'utilizzo della sezione lignocellulosica. Questo ha lo scopo di rompere la struttura della lignina, allontanare l'emicellulosa e separare la struttura della cellulosa al fine di aumentare l'esposizione agli enzimi nella fase d'idrolisi (Mosier *et al.*, 2005b) (Figura 1.2).



**Figura 1.2** Effetto del pretrattamento sull'organizzazione strutturale della parete cellulare

I metodi normalmente usati per condurre il pretrattamento della lignocellulosa sono cinque:

- pretrattamento biologico: si avvale dell'impiego di microrganismi, che attaccano la parete cellulare per via enzimatica, degradando la lignina. Questo metodo richiede un basso contenuto energetico grazie all'utilizzo di microrganismi. In particolare sono in corso di studio alcuni funghi basidiomiceti, tra cui *Phanerochaete chrysosporium*.
- pretrattamento alcalino con NaOH: il pretrattamento è eseguito alla temperatura di 80-120°C per 30-60 minuti, utilizzando la soda in soluzione acquosa al 8-12% in peso. Il maggior svantaggio di questa tecnica sono gli ingenti costi dovuti ai reagenti chimici e alle misure di sicurezza nello stoccaggio e nella manipolazione;
- tramite il metodo “*Ammonia Fiber EXplosion*” (AFEX): la biomassa viene sottoposta all'azione dell'ammoniaca ad una temperatura di 27° C e pressione di 1,24 MPa. La successiva brusca riduzione della pressione causa la rapida espansione della biomassa pretrattata. Questo metodo aumenta la superficie accessibile agli enzimi, ma provoca la formazione di composti tossici ed inibitori seppur in basse quantità ed è applicabile solo a biomasse con basso contenuto in lignina.

La sostituzione dell'ammoniaca con l'anidride carbonica può ridurre gli elevati costi che caratterizzano tale metodo. L'anidride carbonica verrebbe impiegata come fluido supercritico, agendo a valori di pressione di 7,6-20,7 MPa.

- mediante *steam explosion*: la biomassa è saturata con acqua, attraverso l'azione del vapore acqueo a pressione (1,5-4,0 Mpa) e temperatura elevate di 180-230°C per un intervallo di tempo che varia da 1 a 10 minuti. Successivamente la biomassa è estrusa in un reattore a pressione atmosferica nella quale subisce una rapida espansione. Tali condizioni operative possono causare una parziale idrolisi delle catene di cellulosa ed emicellulosa. Lo svantaggio principale di questa soluzione tecnica è l'elevato assorbimento energetico;

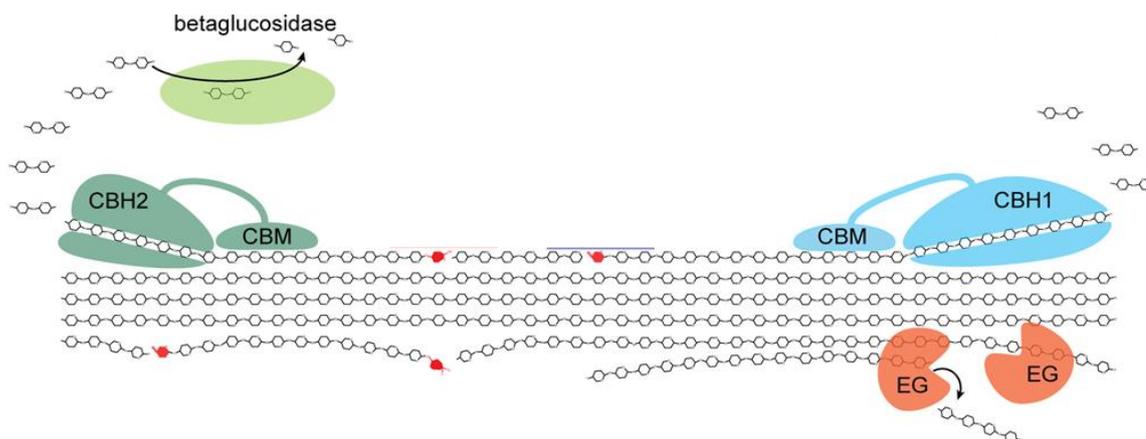
- tramite *steam explosion* con anidride solforosa: l'anidride solforosa (sotto forma di gas) acidifica la biomassa prima di iniziare il pretrattamento *steam explosion* e favorisce l'innescò dell'idrolisi della cellulosa e dell'emicellulosa. Tale tecnica richiede costi elevati dovuti all'assorbimento energetico e all'impiego di reagenti;

#### **1.4.1.1 Il trattamento enzimatico della biomassa**

L'idrolisi della cellulosa e dell'emicellulosa costituisce il passo successivo. Sebbene queste possano essere condotte con reagenti chimici, questa possibilità necessita di elevati costi per l'acquisto e la gestione degli stessi, per cui la prospettiva più interessante è costituita dall'idrolisi enzimatica (Choi *and* Matherws, 1996).

Due caratteristiche importanti sono proprie degli enzimi, ovvero che sono altamente specifici e possono lavorare in condizione di processo non estreme, motivi per cui l'uso di enzimi nell'idrolisi della cellulosa è più vantaggioso rispetto all'uso di prodotti chimici. Sebbene mostrino vantaggi, l'uso di enzimi nelle applicazioni industriali è ancora limitato da fattori quali gli elevati costi di isolamento e purificazione degli stessi (Verardi *et al.*, 2012). Per rompere le catene di cellulosa ed emicellulosa si ricorre al sistema attualmente più esplorato che prevede l'utilizzo di *Trichoderma reesei*, è un fungo ascomicete, noto come produttore efficiente di enzimi extracellulari quali:

- esocellulasi (1,4-  $\beta$ -D-glucan-glucanoidrolasi o cellodestrinasi) attaccano le catene esterne, rilasciando zuccheri semplici (monomeri e dimeri),
- endocellulasi (1,4-  $\beta$ -D-4-glucanidrolasi) rompono le catene in frammenti più piccoli partendo dall'interno,
- $\beta$ -glucoside glucoidrolasi o  $\beta$  glucosidasi scinde i dimeri in monomeri, rilasciando soprattutto glucosio.



**Figura 1.3** Degradazione enzimatica della cellulosa. Abbreviazioni: EG, endoglucanasi; CBH, cellobioidrolasi; CDH, cellobiosio-deidrogenasi; CBM, carbohydrate-binding module. Da notare che molti sistemi enzimatici cellulolitici hanno diversi EG e/o CBH che possono attaccare il substrato in più punti.

Dopo aver idrolizzato la biomassa, si prosegue con la fermentazione alcolica.

L'intensa ricerca che interessa le materie lignocellulosiche, è essenzialmente mirata a semplificare il processo di idrolisi enzimatica con le successive fasi della trasformazione.

### 1.4.2 La fermentazione alcolica

La fermentazione è un processo metabolico in cui microrganismi, in genere *S. cerevisiae*, trasformano gli zuccheri semplici in etanolo. Dopo circa 48-72 ore, si ottiene una soluzione acquosa di alcool all'8-10%. A causa di alcune condizioni che si generano durante la fase della fermentazione alcolica, riguardanti ad esempio la concentrazione di glucosio e di alcool, la crescita dei microrganismi può essere inibita. Per questa ragione, se la fermentazione avviene in un fermentatore discontinuo (batch), ci sono dei limiti da tenere sotto controllo. Considerando che la soluzione zuccherina (melassa) ha tenori di glucosio che non superano il 20%, l'efficienza di questo substrato non potrà superare l'85-90% perché una parte del glucosio viene anche utilizzata dal microrganismo per crescere. Dunque l'ammontare di un prodotto a partire da un certo substrato, ovvero il coefficiente di resa del fermentatore, si

aggira intorno a 0,5-0,6 g di etanolo da 1g di glucosio. Se si utilizza un bioreattore in continuo, cioè un sistema "aperto", si possono ottenere risultati migliori, perché il mezzo fresco è aggiunto continuamente mantenendo inalterato il volume del mezzo di fermentazione, questo consente di mantenere la concentrazione di etanolo entro i valori di tolleranza del microrganismo stesso.

### **1.4.3 La distillazione: ultima fase del processo produttivo**

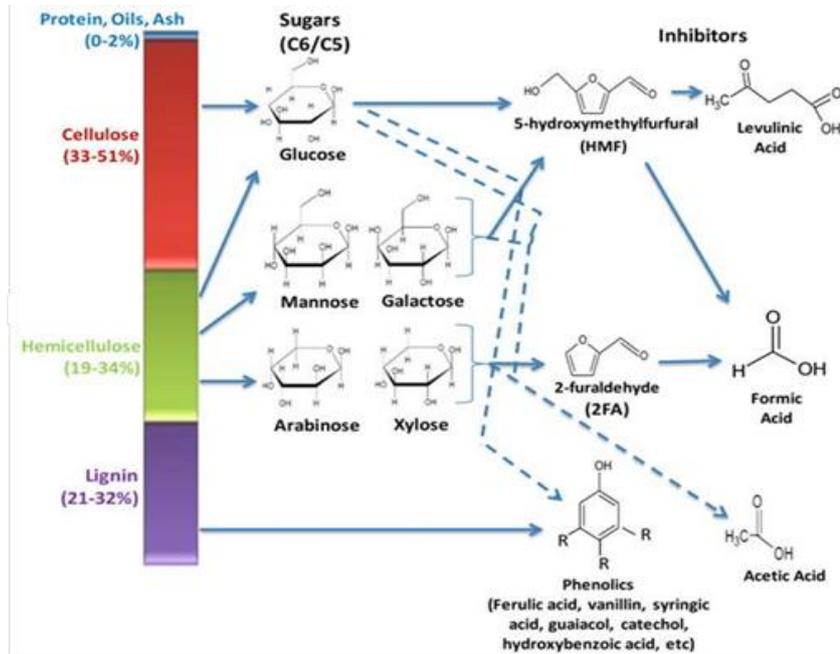
Fino ad oggi la distillazione è il metodo di separazione dei fluidi più diffuso; utilizza una tecnologia secondo cui la miscela di interesse, attraverso una serie di fasi di evaporazione/condensazione, viene separata nelle frazioni componenti (etanolo e scarti acquosi), con grado di purezza variabile (Albergo *et al.*, 2013). La distillazione chimica permette di ottenere bioetanolo ad una concentrazione del 95% in volume (bioetanolo azeotropo); la parte restante pari al 5% (acqua e sostanze volatili) viene separato durante la fase di disidratazione con diverse soluzioni tecniche. Tuttavia l'elevato fabbisogno energetico, sia per il riscaldamento che per il raffreddamento dell'impianto, costituisce la parte più importante nel costo totale del processo produttivo.

### **1.5 Una conseguenza della fase di pretrattamento: la formazione di inibitori**

I metodi precedentemente descritti per il pretrattamento della biomassa lignocellulosica producono una grande varietà di composti (Figura 1.4). Durante l'idrolisi della cellulosa il D-glucosio è lo zucchero prodotto in misura maggiore, mentre gli altri zuccheri quali il D-galattosio, il D-mannosio e il D-ramnosio (zuccheri esosi), come anche il D-xilosio e L-arabinosio (zuccheri pentosi) sono rilasciati in seguito ad idrolisi dell'emicellulosa. Altri composti derivano dall'idrolisi dell'emicellulosa quali ad esempio gli acidi uronici (per esempio, l'acido 4-O-metilglucuronico). Infine, la lignina, un complesso polimero aromatico insolubile in acqua, è formata da unità di fenilpropano.

L'azione enzimatica provoca una parziale digestione della lignina, della cellulosa e dell'emicellulosa. Gli zuccheri rilasciati dalla degradazione della cellulosa e dell'emicellulosa possono essere raggruppati in tre principali tipologie di composti:

- (I) derivati del furano (2-furaldeide e 5-idrossimetil-2-furaldeide);
- (II) acidi deboli (maggiormente acidi acetico, levulinico, formico);
- (III) composti fenolici (vanillina, aldeide siringica, aldeide coniferilica,).



**Figura 1.4** Composizione media della biomassa lignocellulosica e principali prodotti derivati dalla sua idrolisi.

Gli zuccheri liberati dalla degradazione dei polisaccaridi contenuti nelle materie prime utilizzate, a seguito di trasformazioni chimiche, daranno vita ai seguenti inibitori della successiva fase di fermentazione:

### (I) Derivati del furano.

I derivati del furano come 2-furaldeide (furfurale) e 5-idrossimetil-2-furaldeide (HMF) si formano in seguito a deidratazione rispettivamente di pentosi ed esosi (Dunlop, 1948; Ulbricht *et al.*, 1984). Il livello dei furani varia in relazione alle caratteristiche fisico-chimiche del materiale grezzo e del tipo di pretrattamento utilizzato. A titolo esemplificativo, la concentrazione di HMF negli idrolizzati di abete rosso (*Picea abies*) possono variare dai 2,0 ai 5,9 g/L a seconda che l'idrolisi con acido diluito venga eseguita in uno o due passaggi

(Almeida *et al.*, 2007; Larsson *et al.*, 1999b; Nilvebrant *et al.*, 2003). Nonostante il furfurale sia generalmente presente in quantità minori rispetto al HMF, è spesso presente in concentrazioni tali da essere inibenti per la crescita del microrganismo fermentante (circa 1 g/L).

## **(II) Acidi deboli**

Gli acidi deboli più comunemente presenti negli idrolizzati di matrici lignocellulosiche sono l'acido acetico, levulinico e formico. L'acido formico e levulinico si generano dalla degradazione dell'HMF e furfurale. Inoltre, l'acido formico può formarsi dal furfurale in condizioni di elevata acidità e di elevata temperatura. La de-acetilazione delle catene di emicellulosa causa la formazione dell'acido acetico.

## **(III) Composti fenolici.**

Durante l'idrolisi acida, una notevole quantità di composti fenolici viene generata dalla degradazione della lignina e dei vari polisaccaridi. Il tipo e la concentrazione di questi composti dipende dal tipo di biomassa, questo perché nella parete cellulare delle varie specie vegetali la lignina si presenta con strutture molecolari molto diverse, come anche il grado e il modo in cui si associa a emicellulosa e a cellulosa (Perez *et al.*, 2002).

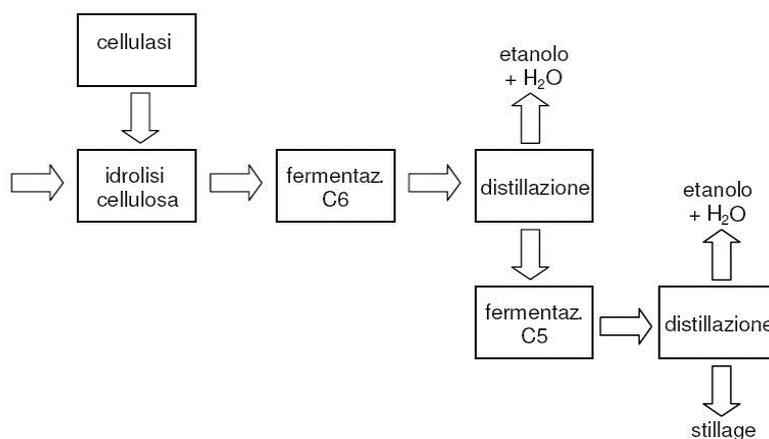
I fenoli sono suddivisi in tre gruppi in base al numero di gruppi metossilici (H, G, S) e della loro funzionalità (aldeidi, chetoni, acidi e altro). I materiali provenienti da legno duro o erbaceo presentano nella loro biomassa quantità più consistenti di fenoli H, G e S, mentre i materiali provenienti da legno producono soprattutto fenoli guaicilici (G). Dunque, i composti aromatici che si trovano negli idrolizzati dipendono dal tipo di pretrattamento e dal rapporto H/G/S della lignina presente nella biomassa. I fenoli principalmente trovati, sono la vanillina, la 4-idrossibenzaldeide, l'aldeide coniferilica, l'acido 4-idrossibenzoico, l'acido siringico e l'aldeide siringica. I monomeri del fenolo sono stati caratterizzati e quantificati in diversi idrolizzati lignocellulosici di pino, quercia, salice, abete rosso, crusca di frumento, bagasso, pioppo, insilato di mais ed erbacee perenni (Almeida *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 1984; Klinke *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 1986).

## 1.6 Soluzioni tecniche per la produzione di bioetanolo di seconda generazione

Per produrre bioetanolo di seconda generazione sono state attuate diverse soluzioni tecniche, atte a incorporare tutte le fasi della filiera produttiva tranne il pretrattamento (vedi paragrafo 1.3.1). Ridurre progressivamente il numero di reattori può infatti contribuire a diminuire notevolmente i costi dell'impianto (Mamma *et al.*, 1996; Ohgren *et al.*, 2006).

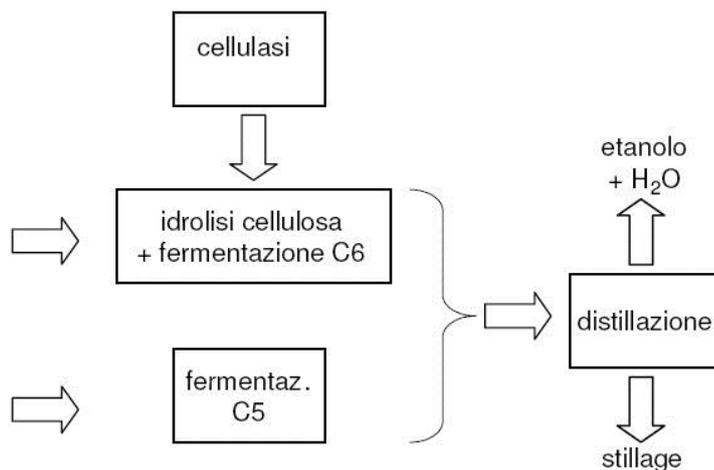
Di seguito sono spiegate e illustrate le diverse configurazioni sperimentali che attualmente esistono (SHF, SSF e SSCF).

- SHF (Separated Hydrolysis and Fermentation) è il metodo più semplice realizzato per la conversione in bioetanolo a partire dai materiali sopra descritti. Questo impianto comprende quattro differenti reattori che lavorano uno di seguito all'altro in cui hanno luogo tre delle fasi della filiera: idrolisi mediante cellulasi commerciali, fermentazione degli zuccheri esosi e fermentazione dei pentosi (Figura 1.5). Il principale vantaggio è che ciascuna fase risulta indipendente, dato che ogni fase avviene in un reattore diverso, per cui è possibile ricercare e applicare sempre le condizioni ottimali specifiche per quella fase. Invece, il maggiore svantaggio è l'elevato costo dovuto al fatto che è necessaria una gestione differente per ogni stadio del processo. Inoltre va considerata la possibilità dell'accumulo di zuccheri che possono andare ad inibire l'attività enzimatica durante lo stadio d'idrolisi (Albergo *et al.*, 2013).



**Figura 1.5** Schema della configurazione SHF (Separated Hydrolysis and Fermentation).

- Una maggiore efficienza nella produzione di bioetanolo può essere raggiunta usando contemporaneamente l'idrolisi e la fermentazione degli zuccheri, processo denominato SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation). Questa soluzione tecnica ha origine da un miglioramento del sistema SHF, in cui si ha la riduzione del numero di reattori a due: il primo per l'idrolisi ad opera delle cellulasi commerciali e per la fermentazione degli zuccheri esosi, il secondo per la fermentazione dei pentosi (Figura 1.6). Questo modello può diminuire notevolmente i costi energetici del processo e incrementare il tasso d'idrolisi della cellulosa, se il microrganismo che fermenta e l'enzima commerciale agiscono alle stesse condizioni (pH, temperatura). In più con questo sistema il glucosio viene utilizzato dal microrganismo fermentante in simultanea al processo di idrolisi evitando l'accumulo dei prodotti finali d'idrolisi che rallentano la fermentazione.



**Figura 1.6** Schema della configurazione SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation).

- SSCF (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation) è il risultato di un progressivo miglioramento delle tecnologie precedenti caratterizzato dalla simultanea saccarificazione e co-fermentazione in un unico reattore. Questo processo prevede il contemporaneo utilizzo di cellulasi commerciali e microrganismi in grado di fermentare zuccheri pentosi ed esosi. La coesistenza di entrambe le famiglie di zuccheri potrebbe comportare l'inibizione degli enzimi e

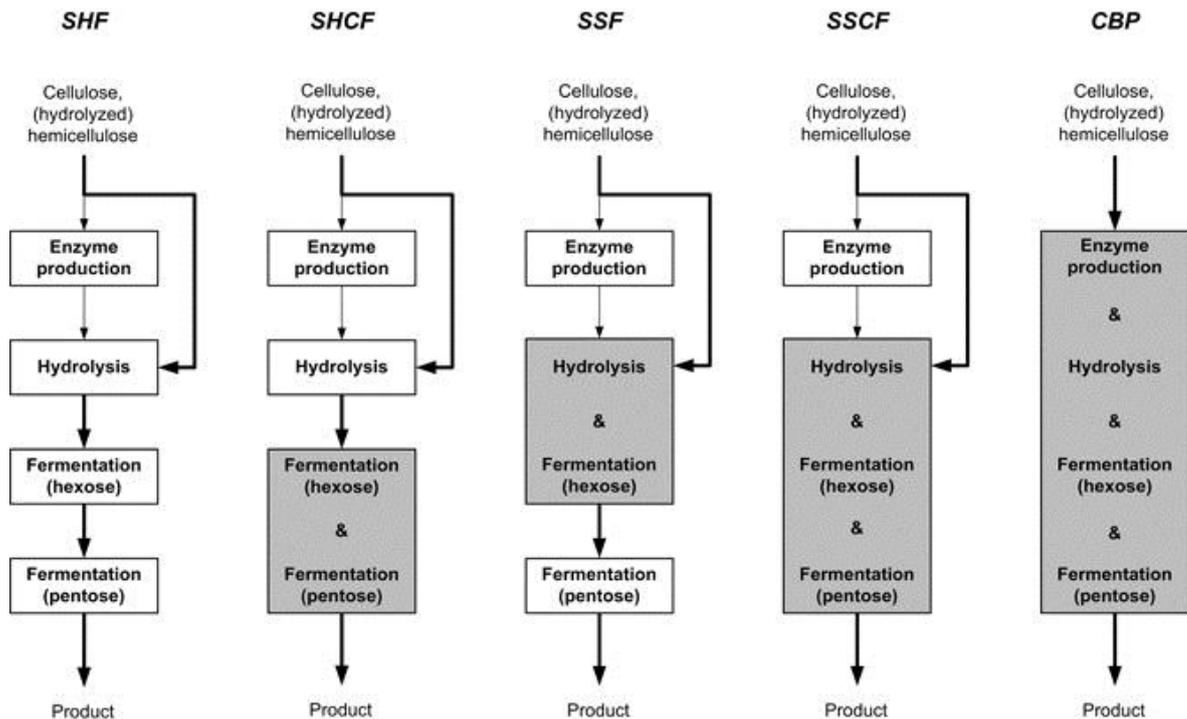
questo risulta essere uno dei limiti di questo impianto. Inoltre, ulteriori ricerche vanno condotte per realizzare ceppi ingegnerizzati che siano in grado di soddisfare le condizioni richieste.

Ad oggi ci sono stati molti studi riguardanti i pretrattamenti di materiale lignocellulosico che mirano al raggiungimento del massimo quantitativo di zucchero, ma pochi sono i lavori che riportano l'uso di lieviti selezionati nella successiva fase di fermentazione (Favaro *et al.*, 2012a). L'utilizzo di un organismo fermentativo e amilolitico all'interno di un processo SSF fa sì che avvenga contemporaneamente sia l'idrolisi enzimatica che la fermentazione, incrementando l'efficienza energetica, riducendo la dipendenza da enzimi commerciali (amilasi) e i costi di produzione. A tal riguardo il lievito che più si addice a queste tecnologie di produzione, è *S. cerevisiae* in quanto è GRAS (Generally Regarded As Safe), ha elevata *performance* fermentativa (alto vigore fermentativo), elevata tolleranza agli inibitori e all'etanolo oltre che la capacità di crescere in condizioni di anaerobiosi.

### **1.6.1 Il modello CBP (Consolidated BioProcessing) come il sistema produttivo più vantaggioso**

Un metodo di conversione dell'amido ad etanolo ancora più efficiente rispetto a quelli fino ad ora citati è il processo CBP (Consolidated BioProcessing). Questo modello utilizza un singolo microrganismo che è in grado di liquefare, saccarificare e fermentare l'amido grezzo in etanolo attraverso un'unica fase, poiché si basa sull'efficace integrazione in un unico fermentatore dei processi biologici richiesti per la conversione della lignocellulosa (Figura 1.7). In tal modo si riducono i requisiti di richiesta energetica e si semplifica la produzione di biocarburante dall'amido (Favaro *et al.*, 2012b).

In natura non esistono microrganismi capaci di avere nello stesso tempo le capacità richieste nel processo del CBP, anche se ci sono microrganismi, funghi e batteri (sia mesofili che termofili quali *Fusarium oxysporium*, *Clostridium*, e *Trichoderma*) che offrono alcune delle proprietà richieste come la produzione di enzimi cellulolitici o l'elevata capacità fermentativa (van Zyl *et al.*, 2007).



**Figura 1.7** Confronto tra le diverse configurazioni tecnologiche utilizzate nella conversione delle materie prime vegetali in bioetanolo con i relativi cambiamenti apportati dall'avanzamento degli studi. (In Jäger *et al.* (2012)).

In questo campo la ricerca punta ad esprimere efficienti enzimi saccarolitici (cellulasi, emicellulasi ed amilasi) in ceppi di *S. cerevisiae*, che restano in ogni caso gli organismi da preferire per la fase fermentativa della produzione di etanolo. Un microrganismo CBP richiede l'espressione di enzimi capaci di sostenere la sua crescita su amido grezzo (come unica fonte di carbonio) e nel contempo sia in grado di garantire un'efficiente conversione in etanolo (Favaro *et al.*, 2013b; Viktor *et al.*, 2013).

In questo modo il ceppo ideale dovrebbe essere in grado di idrolizzare la cellulosa, fermentare pentosi ed esosi e dimostrarsi tollerante alla eventuale presenza di inibitori e alle condizioni di stress proprie di un impianto industriale. Verso questa direzione, si muovono le ultime strategie molecolari e di selezione con l'obiettivo di sviluppare un lievito ricombinante che possieda tutte le caratteristiche richieste per poter essere impiegato nel processo CBP su scala industriale (Tabella 1.2).

<b>Caratteristiche richieste</b>	<b>Presenza nei ceppi esistenti di <i>S. cerevisiae</i></b>
<b><i>Caratteristiche necessarie:</i></b>	
Capacità fermentativa di zuccheri esosi e pentosi	Solamente C6 in ceppi industriali e <i>wild-type</i> Utilizzo parziale dei C5 ottenuta in ceppi ricombinanti
Alta capacità fermentativa	In molti ceppi
Resistenza ad elevate concentrazioni di etanolo	In molti ceppi
Tolleranza dei processi industriali	In molti ceppi
Alto livello di espressione di geni eterologhi	In ceppi di laboratorio
Alto livello di produzione di proteine eterologhe	In ceppi di laboratorio e in alcuni ceppi industriali
<b><i>Caratteristiche desiderabili:</i></b>	
Simultanea fermentazione degli zuccheri	Ceppi industriali ingegnerizzati per la fermentazione di glucosio e maltosio
Riutilizzabilità	In molti ceppi
Aggiunta minima di nutrienti	Molti ceppi industriali, in modo particolare in quelli utilizzati per vinificazione
Capacità di adattamento alla manipolazione genetica	Tutti i ceppi di laboratorio e alcuni ceppi industriali

**Tabella 1.2** Caratteristiche richieste e desiderabili per un ceppo di *S. cerevisiae* impiegabile in un processo CBP (modificato da Lynd, 1996 e Zaldivar *et al.*, 2001).

## 1.7 Il Progetto BioRivaluta

Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito del Progetto BioRivaluta della regione Veneto attraverso la misura 124 del PSR (Piano di sviluppo Regionale) con lo scopo di implementare dei sistemi innovativi per la conversione di biomasse residuali in bioetanolo.

Gli scarti agricoli e gli scarti/residui di lavorazione delle industrie alimentari rappresentano biomasse di varia composizione chimica e, quindi, necessitano di diversi trattamenti chimico-fisici e/o di ceppi di lievito con proprietà specifiche adatte al substrato disponibile (es. miglior vigore fermentativo a carico di un determinato carboidrato, resa in etanolo, resistenza agli inibitori, reimpiego della frazione ligninica, superamento del potere recalcitrante della frazione lignocellulosica, ecc.).

Di recente, è stato depositato un Brevetto Internazionale (WO/2011/128712) relativo all'isolamento e al miglioramento di un lievito per la produzione di bioetanolo da lignocellulosa. Questa invenzione prevede che in un ospite eterologo, il *S. cerevisiae*, siano stati espressi gli enzimi  $\alpha$ -amilasi e glucoamilasi fornendo microrganismi più competitivi per l'industria energetica. Le conoscenze scientifiche acquisite con il Brevetto dimostrano che anche i migliori ceppi di lievito si adeguano alla tipologia del substrato di crescita, modulando i loro processi di trasformazione biochimica.

Sebbene il Progetto BioRivaluta sia centrato sugli scarti agricoli della viticoltura, l'interesse si estende su ogni tipo di biomassa residua a livello agricolo e agro-alimentare che presenta costi e problemi di smaltimento. In questo modo, sia gli esuberi alimentari sia gli scarti agricoli (frutta marcia, potature, ecc.) possono diventare delle fruttuose risorse energetiche aprendo la strada alla realizzazione dei biocarburanti di seconda generazione.

Sulla base di ciò, sfruttando le esperienze e le conoscenze dei diversi collaboratori del progetto, si è stabilito primariamente di avviare un'indagine conoscitiva delle potenziali risorse energetiche a basso costo disponibili nel territorio (Figura 1.8) e successivamente di:

- i. effettuare studi sulle caratteristiche chimico-fisiche dei campioni organici inventariati per scoprire quanto siano idonei come substrati energetici per la bioconversione in etanolo,
- ii. selezionare quelle matrici organiche rivelate potenzialmente più adatte,
- iii. determinare i processi di pretrattamento chimico-fisico-enzimatici conformi alle caratteristiche delle matrici organiche e trovare quei ceppi microbici, se necessario ingegnerizzati, adatti alla conversione della biomassa tal quale o pretrattata per la conversione in etanolo,

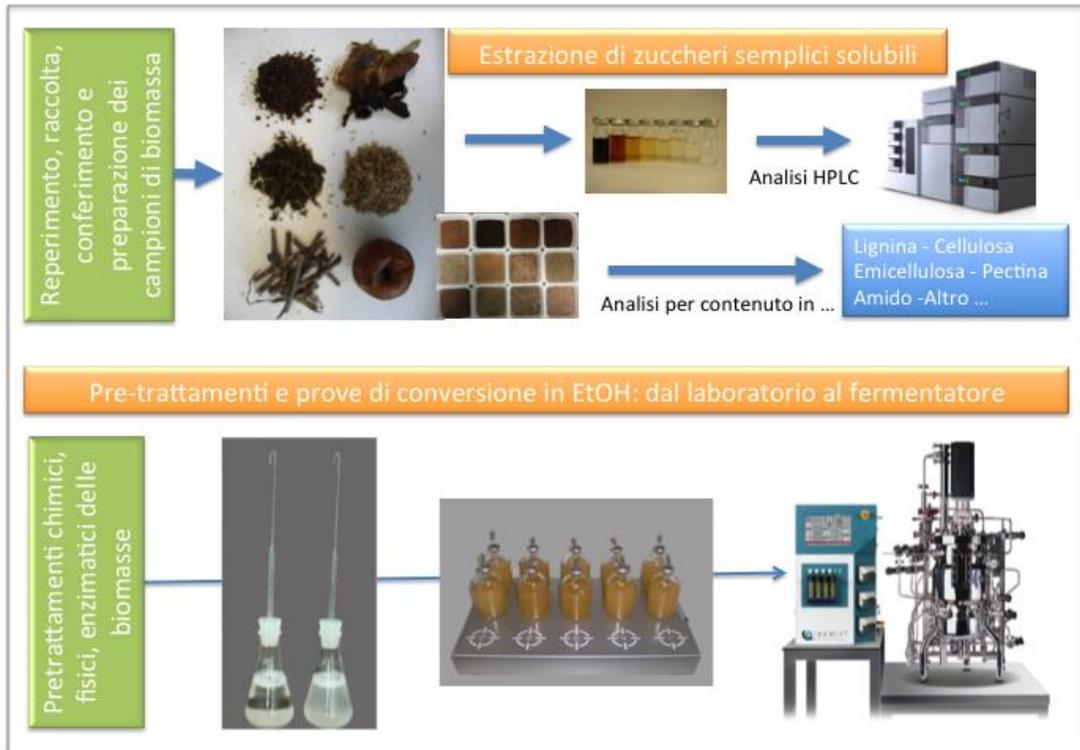
- iv. commisurare e valutare i dati ottenuti di rese potenziali con quelli trovabili in letteratura scientifica,
- v. trovare vie alternative per adattare i substrati non idonei alla bioconversione in etanolo,
- vi. presentare metodi e sistemi applicabili per la valorizzazione energetica dei residui post-fermentazione.



**Figura 1.7** Areale oggetto di studio in base ad un’analisi produttiva, qualitativa, tecnologica e logistica del territorio veneto.

L’analisi quantitativa, ovvero i punti i, ii, iii, iv sopraelencati, è stata eseguita sui campioni censiti applicando diverse analisi specifiche come l’estrazione degli zuccheri solubili e la determinazione chimica dei componenti strutturali come viene illustrato in Figura

1.9. Successivamente, nei substrati ritenuti idonei sono state eseguite diverse prove di pretrattamento, ad esempio, con acidi o basi a diverse concentrazioni e ad alte temperature, e diverse prove di fermentazione per individuare i substrati con alta resa in bioetanolo e basso costo di produzione.



**Figura 1.9** Metodologia impiegata dai ricercatori dell'Università di Padova per individuare la possibile fruizione delle singole biomasse residuali come risorse energetiche.

## **2 SCOPO DELLA TESI**

Il presente lavoro di tesi, inserito nel Progetto BioRivaluta, è mirato alla valutazione di alcuni scarti risultanti dalle attività agricole e dall'industria di trasformazione alimentare reperibili in Regione Veneto, valutandone le potenzialità di bioconversione in etanolo sulla base della loro composizione chimica. Successivamente alcuni scarti, in base ai volumi di biomasse disponibili e alla composizione delle singole matrici, sono stati utilizzati come substrati "reali" in esperimenti di fermentazione in laboratorio determinando l'effettiva resa in etanolo.

### 3 MATERIALI E METODI

#### 3.1 Mezzi colturali di crescita

I mezzi colturali utilizzati in questo studio sono riportati in Tabella 3.1, tutti sono stati sterilizzati in autoclave per 20 minuti a 121 °C.

Terreno colturale	Ditta produttrice o composizione (g/L)
Yeast Nitrogen Base without amino acids (YNB)	DIFCO (6,7 g/L yeast nitrogen base without amino acids; 1 g/L glucosio; tampone citrato-fosfato 0.05 M a pH 5.0)
Yeast Peptone Dextrose (YPD)	DIFCO (10 g/L estratto di lievito; 10 g/L peptone; 20 g/L glucosio)
Mezzo Fermentazione di Controllo (MFC)	6,7 g/L YNB; saccarosio, glucosio e fruttosio <sup>a</sup> ; tampone citrato-fosfato 0,05 M a pH 5,0

<sup>a</sup>Nel MFC la composizione degli zuccheri varia a seconda del substrato fermentato di riferimento

**Tabella 3.1** Terreni colturali impiegati.

#### 3.2 Ceppo microbico e condizioni di crescita

In questo studio è stato impiegato il ceppo di lievito *S. cerevisiae* MEL2, isolato da vinaccia d'uva e selezionato per il suo elevato vigore fermentativo ed alta tolleranza agli inibitori derivanti dal pretrattamento della lignocellulosa (Favaro *et al.*, 2013a,b).

Per l'esecuzione degli esperimenti, *S. cerevisiae* MEL2 è stato mantenuto su YPD agarizzato.

Per la preparazione del pre-inoculo, il ceppo di lievito è stato inoculato in YPD ed è stato incubato overnight a 30°C su un agitatore basculante a 130 rpm. La pre-coltura è stata centrifugata (5500 rpm, 2 min) e il pellet ottenuto lavato 2x in H<sub>2</sub>O demineralizzata sterile e risospeso in 5 mL. Questa sospensione è stata utilizzata per l'inoculo nelle prove di fermentazione descritte nel paragrafo 3.8.

### **3.3 Determinazione della composizione qualitativa di scarti e residui agro-industriali**

Campioni rappresentativi dei residui agro-industriali censiti nell'ambito del Progetto BioRivaluta sono stati analizzati per la determinazione degli zuccheri semplici solubili mediante estrazione in acqua. Inoltre, ne è stata determinata la composizione in emicellulosa, cellulosa, lignina, amido, proteina grezza, ceneri e sostanza secca. A tal fine, la maggior parte dei campioni è stata essiccata a 65 °C in stufa ventilata per 48 h. Per alcuni campioni, come indicato in Tabella 3.2, si è preferito utilizzare la liofilizzazione per evitare Reazione di Maillard o fenomeni di caramellizzazione che si erano verificati dopo essiccamento in stufa; altri campioni che presentavano un'umidità iniziale inferiore al 13% non sono stati essiccati ma processati direttamente. Successivamente i campioni sono stati macinati con un mulino elettrico a martelli di 380 V e 1000 giri/min e conservati in sacchetti plastici a temperatura ambiente per le analisi successive.

I campioni, denocciolati quando necessario, sono stati analizzati per il contenuto dei zuccheri semplici (glucosio, fruttosio, saccarosio, xilosio, arabinosio, ramnosio, mannosio, cellobiosio e maltosio) secondo il metodo descritto da Usenik *et al.* (2008): in breve sono stati omogeneizzati con un mixer, la purea ottenuta (10 g) è stata risospesa in 50 mL di acqua bidistillata per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopodiché le sospensioni sono state centrifugate a 12.000 giri per 7 minuti a 10 °C. I surnatanti, dopo essere stati filtrati usando filtri a siringa ministart in acetato di cellulosa 0,2 µm, sono stati trasferiti in vials (Figura 3.1) e analizzati mediante HPAEC-PAD (*High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*) utilizzando una colonna PA1 e come fase mobile NaOH (1mM). Si è inoltre impiegato un auto-campionatore (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) e una portata di 1 mL/min a temperatura ambiente.

Campioni essiccati in stufa a 65°C per 48 h	Campioni analizzati tal quale	Campioni liofilizzati
Sansa di olive; Potatura di olivo; Sansa di olive denocciolata; Pianta di pomodoro, peperone e melanzana sotto serra; Vinaccia bianca con raspi; Tralci di vite (Garganega e Valpolicella); Raspi d'uva; Vinaccia dolce non fermentata d'uva bianca; Vinaccia fermentata d'uva rossa; Scarto di lavorazione di radicchio: foglie di radicchio triturate e foglie di radicchio integre; Cavolo cinese per commercializzazione; Zucchine; Cetrioli di scarto, Pomodoro e Melanzana da consumo; Cipolla di scarto; Scarto di lavorazione di patate; Potatura verde di Cabernet-Sauvignon e Chardonnay; Scarto di passatrice di pomodoro da industria e di pera; Pomodoro da industria; Scarto di prugne; Lolla e Farinaccio di riso; Riso macchiato; Riso rotto; Grana verde di riso; Baccelli di fagioli borlotti; Foglie e colletti di barbabietola da zucchero; Scarto di fagiolini-cornetti; Tabacco coltivato per biomassa e per produzione di semi per oli carburanti; Paglia di riso e Potature di <i>Cupressocyparis x leylandii</i>	Paglia di frumento; Soia e Paglia di orzo	Albicocche intere; Sansa di albicocche; Melone di scarto; Frutti di <i>Prunus pissardi</i> Nigra; Pesche nettarine di scarto; Scarto di passatrice di pesche nettarine; Pera integra; Scarto misto di frutta e verdura; Scarto di mele per industria (varietà gialle e rosse)

**Tabella 3.2** Campioni di sottoprodotti censiti per il Progetto BioRivaluta ed analizzati per il loro contenuto in zuccheri semplici e per la loro composizione in polisaccaridi, lignina, ceneri, proteina grezza e sostanza secca.

Sulla base del contenuto in zuccheri semplici fermentescibili (glucosio, fruttosio, saccarosio e maltosio) e in cellulosa ed amido, è stato determinato il potenziale di etanolo teorico (kg) ottenibile per tonnellata fresca di ciascun substrato censito. In particolare per i

monosaccaridi, è stata ipotizzata una resa prudenziale di 0.49 g di etanolo per g di zucchero. Per quanto riguarda invece la cellulosa è stato considerato una resa prudenziale di 0,21 g di etanolo per g di cellulosa. Infine, nel caso di amido, è stato utilizzato un parametro di efficienza fermentativa prudenziale pari a 0,5 g di etanolo per g di polisaccaride.



**Figura 3.1** Vials contenenti il surnatante filtrato utilizzato per l'analisi degli zuccheri semplici presenti nei sottoprodotti censiti in BioRivaluta.

L'analisi chimica dei campioni per il contenuto in lignina, cellulosa, emicellulosa, amido, proteina e ceneri è stata svolta dal laboratorio chimico La-Chi di DAFNAE secondo metodi internazionali standard (AOAC, 2010).

### **3.4 Trattamento con enzimi commerciali per la saccarificazione delle biomasse lignocellulosiche**

In questo lavoro, sono stati utilizzati complessi enzimatici commerciali per scindere le componenti di cellulosa ed emicellulosa, che costituiscono le biomasse lignocellulosiche, in zuccheri esosi e pentosi (Tabella 3.3).

Complesso enzimatico	Tipi di enzimi	Ceppo di riferimento per la produzione degli enzimi	Ditta fornitrice
NS50012	Cellulasi, arabinasi, beta-glucanasi, emicellulasi e xilanasi	n.d. <sup>a</sup>	Novozymes
AlternaFuel CMAX	Cellulasi, beta-glucosidasi, emicellulasi e arabinasi	<i>Myceliophthora thermophila</i>	DYADIC

<sup>a</sup>n.d. = non disponibile

**Tabella 3.3** Complessi enzimatici utilizzati.

Nella Tabella 3.4 sono riportati alcuni dati presenti nelle schede tecniche dei complessi enzimatici commerciali (range di pH e di temperatura e il dosaggio raccomandato dalle ditte fornitrici). Tali informazioni sono state fondamentali per iniziare la messa a punto di un processo di idrolisi enzimatica sulle diverse tipologie di biomassa lignocellulosica selezionate per il loro elevato potenziale di conversione in bioetanolo nel corso del Progetto BioRivaluta.

Complesso enzimatico	Attività specifica	pH	Temperatura (°C)	Dosaggio
NS50012	100 FBG <sup>a</sup> /g	3,3–5,5 (5,0) <sup>b</sup>	25–55 (55) <sup>b</sup>	0,05–0,4% (% peso/peso secco substrato)
AlternaFuel CMAX	>15000 CMCasi <sup>c</sup> /g	3,5–8,0 (6,0) <sup>d</sup>	35-80 (55) <sup>d</sup>	1,5–5% (g enzima/g cellulosa)

<sup>a</sup>FBG: Fungal  $\beta$ -Glucanase Units; <sup>b</sup>pH 5,0 e temperatura 55 °C: valori ottimali per NS50012; <sup>c</sup>CMCasi: CarbossiMetil Cellulasi; <sup>d</sup>pH 6,0 e temperatura 55 °C: valori ottimali per AlternaFuel CMAX

**Tabella 3.4** Specifiche tecniche dei complessi enzimatici impiegati in questo lavoro di tesi. I valori di questi parametri sono forniti dalle rispettive ditte produttrici.

### **3.4.1 Determinazione dell'attività enzimatica degli enzimi commerciali**

Per uniformare i dati di attività enzimatica forniti dalle ditte produttrici (che usano Unità enzimatiche differenti a parità di enzima), si è deciso di determinare di nuovo le attività cellulasi, emicellulasi ed amilasi, presenti nei complessi multi-enzimatici considerati. Come substrati modello sono stati usati: CarbossiMetilCellulosa (CMC), xilano ed amido solubile. In breve, aliquote di 50  $\mu\text{L}$  di ciascun complesso enzimatico opportunamente diluito sono state aggiunte a 450  $\mu\text{L}$  di tampone citrato-fosfato 0,05 M a diversi pH (5,0 e-6,0) contenente CMC 1%, o xilano 1% od amido solubile 0,1%. L'incubazione è avvenuta a 50°-60° C per 10 minuti.

L'attività enzimatica è espressa in U/mL, ovvero millimoli di glucosio rilasciate per millilitro per minuto ed è stata valutata secondo il metodo dell'acido DiNitroSalicilico (DNS) descritto da Miller (1959).

### **3.5 Saccarificazione dei substrati lignocellulosici tramite enzimi commerciali**

I substrati lignocellulosici più promettenti in termini di potenzialità ad essere convertiti in bioetanolo sulla base della loro composizione chimica, sono stati quindi sottoposti a numerose prove di saccarificazione enzimatica utilizzando complessi enzimatici commerciali (Tabella 3.3) per determinare in maniera precisa il quantitativo di zuccheri utilizzabili nella successiva fase di fermentazione e per individuare il cocktail di enzimi commerciali in grado di dare una resa di saccarificazione più alta.

In questo studio, i campioni utilizzati nelle prove di saccarificazione sono stati: sansa di olive, sansa di olive denocciolata, piante di pomodoro sotto serra, lolla di riso, potatura di olivo, potatura verde di Cabernet-Sauvignon e tralci di vite. L'idrolisi enzimatica è stata condotta utilizzando un dosaggio di 0,4% (% peso/peso secco substrato) per NS50012 e di 2,5% (g enzima/g cellulosa) per AlternaFuel CMAX. In prove successive, i tralci di vite sono stati idrolizzati anche utilizzando un dosaggio di AlternaFuel CMAX pari al 5%.

Le prove d'idrolisi sono state eseguite in un volume di 25 mL in beute Erlenmeyer (100 mL) chiuse con un tappo in spugna e carta di alluminio utilizzando una concentrazione di substrato pari al 10% di peso secco (% peso/volume) e tampone citrato-fosfato (0,1 M) a pH

5,0 per NS50012 e a pH 6,0 per AlternaFuel CMAX. Ciascuna beuta è stata posta in un incubatore-agitatore-rotante (80 rpm) da laboratorio alla temperatura di 55 °C. L'utilizzo di sodio azide, alla concentrazione finale di 0,02%, ha consentito di evitare possibili contaminazioni microbiche.

Ad intervalli di tempo regolari, sono stati eseguiti campionamenti per analizzare la concentrazione degli zuccheri semplici rilasciati (glucosio, xilosio, arabinosio, ramnosio, mannosio, cellobiosio e maltosio). I campioni prelevati sono stati centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti e il surnatante separato è stato processato come indicato nel paragrafo 3.3.

La concentrazione di glucosio rilasciata dalle cellulasi è stata usata per calcolare il grado di saccharificazione (GS) secondo l'Equazione 1.

$$\text{Equazione 1: } GS = \frac{[\text{glucosio } \frac{g}{L}] \times 0,9}{[\text{cellulosa } \frac{g}{L}]} \times 100$$

Il fattore di conversione di 0,9 (162/180) viene applicato a causa della differenza di massa tra l'anello di glucosio anidro e il glucosio, dal momento che una molecola di acqua viene aggiunta durante l'idrolisi della cellulosa (Cripwell *et al.*, 2015)

### **3.6 Prove di pretrattamento e saccharificazione sulle biomasse lignocellulosiche**

Considerato che la biomassa lignocellulosica è altamente recalcitrante all'idrolisi enzimatica (Ioelovich, 2013) sono state eseguite prove di pretrattamento con acido solforico a differenti concentrazioni (1% e 10% peso/peso secco del substrato) al fine di rendere più idrolizzabili alcuni substrati lignocellulosici (Tabella 3.5). La concentrazione di sostanza secca è stata corretta al 10% con acqua deionizzata; è stato aggiunto H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in diverse concentrazioni (Tabella 3.5). I vessel sono stati poi autoclavati a 121 °C per 30 minuti.

Dopo il passaggio in autoclave, il pH è stato corretto con NaOH (5 M), sono stati quindi aggiunti il complesso enzimatico nelle diverse concentrazioni (Tabella 3.5) e NaN<sub>3</sub> 0,02% per evitare contaminazioni microbiche. Ogni beuta è stata posta in un incubatore-agitatore-rotante

(80 rpm) da laboratorio alla temperatura di 55 °C. Gli esperimenti sono stati condotti in duplicato.

Ad intervalli di tempo regolari, sono stati prelevati dalle beute campioni poi processati come descritto nel paragrafo 3.6. Le analisi in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) sono state eseguite non solo per la determinazione degli zuccheri semplici rilasciati (glucosio, xilosio, arabinosio e cellobiosio), ma anche per la determinazione degli inibitori che si sono formati durante il pretrattamento (idrossimetilfurfurale, furfurale, acido acetico, acido formico e glicerolo). Per la determinazione degli inibitori è stata usata una colonna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, USA) a 65 °C, una fase mobile H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mM) con una portata di 0,5 mL/min e un detector ad indice di rifrazione (Shimadzu, Italy).

Substrato lignocellulosico	Trattamento fisico	Trattamento Chimico	Trattamento enzimatico	
			NS50012 (% peso/peso secco substrato)	AlternaFuel CMAX (g enzima/g cellulosa)
		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
Tralci di vite	X	0%, 1%, 10% (% peso/peso secco substrato)	0,4%	2,5-5%
		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
Lolla di riso	X	0%, 1%, 10% (% peso/peso secco substrato)	0,4%	2,5%

**Tabella 3.5** Tipologie di trattamento eseguite sulle biomasse lignocellulosiche studiate.

### 3.7 Prove di fermentazione di substrati prevalentemente zuccherini

I substrati che sono stati scelti per eseguire le prove di fermentazione, sono prevalentemente zuccherini: frutti di *Prunus pissardi* Nigra, scarto di passatrice di pesche nectarine e scarto di prugne.

I substrati liofilizzati alla concentrazione di sostanza secca pari al 10%, sono stati inseriti in bottigliette di fermentazione dalla capacità di 55 mL, precedentemente sterilizzate mediante autoclave, e poi sono stati aggiunti 24 mL di terreno YNB, ampicillina e streptomina, 100 µg/mL al fine di prevenire possibili contaminazioni batteriche.

Come indicato al paragrafo 3.2, le prove di fermentazione sono state eseguite utilizzando come inoculo il ceppo *S. cerevisiae* MEL2, con una concentrazione di cellule secche iniziale pari a 0,26 g/L. Le bottigliette, dotate di un'uscita per la CO<sub>2</sub>, sono state incubate a 30 °C per 4 giorni in un sistema multistirrer (Figura 3.2) e in condizioni di ossigeno limitato.



**Figura 3.2** Bottigliette da 55 ml poste su agitatore magnetico multistirrer.

Parallelamente, nelle stesse condizioni sperimentali, sono state eseguite delle fermentazioni di controllo senza i residui agro-alimentari, usando il “Mezzo Fermentazione di Controllo” addizionato di quantità diverse di saccarosio, glucosio e fruttosio in relazione alle quantità di zuccheri liberi (saccarosio, glucosio e fruttosio) presenti nei rispettivi substrati.

Le composizioni sono riportate in Tabella 3.6.

<b>Fermentazione di controllo di:</b>	<b>Saccarosio (g/L)</b>	<b>Glucosio (g/L)</b>	<b>Fruttosio (g/L)</b>
Frutti di <i>Prunus pissardi</i> Nigra	0,49	25,37	17,21
Scarto di passatrice di pesche nettarine	1,30	15,67	15,63
Scarto di prugne	1,20	42,67	21,56

**Tabella 3.6** Zuccheri aggiunti nelle prove di controllo.

Ad intervalli di tempo regolari, sono state prelevate aliquote di 2 mL che sono state processate come descritto nel paragrafo 3.6 con lo scopo di determinare etanolo, glucosio, maltosio, glicerolo e acido acetico. L'HPLC impiegata montava una colonna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, USA) a 65 °C, usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mM) come fase mobile, con una portata di 0,5 mL/min e un detector ad indice di rifrazione (Shimadzu, Italy).

Tutte le prove di fermentazione sono state condotte in triplicato.

La resa in alcool etilico, determinata in grammi di etanolo prodotto per grammi di zuccheri fermentescibili consumati, è stata inoltre confrontata in termini percentuali con quella teorica (0,51 g di etanolo per g di glucosio utilizzato). È stato poi valutato un altro parametro di fermentazione: la produttività volumetrica (PV) in etanolo, espressa in g/L/h, ottenuta dividendo i grammi di etanolo prodotti a fine fermentazione per le ore di incubazione.

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Analisi dei principali componenti strutturali degli scarti e residui agroindustriali censiti nel corso del Progetto BioRivaluta

Per poter valutare l'effettiva potenzialità di trasformazione in etanolo degli scarti e residui agroindustriali censiti nell'ambito del Progetto BioRivaluta o per eventuali ulteriori valorizzazioni energetiche, è stata determinata innanzitutto la composizione percentuale dei loro componenti strutturali forniti dal laboratorio chimico La-Chi (Tabella 4.1).

Gli scarti e residui agroindustriali mostrano una composizione varia ed eterogenea e sono, con diverse potenzialità, convertibili in energie rinnovabili quali bioetanolo, biodiesel, bioidrogeno, biometano, biogas e bioolio.

Come riportato da Gelletti *et al.* (2006), per semplicità le biomasse idonee alla trasformazione energetica, sia che essa avvenga utilizzando direttamente la biomassa o previa trasformazione della stessa in un combustibile solido, liquido o gassoso, possono essere suddivise per comparto di provenienza nei seguenti settori:

- comparto forestale e agroforestale: residui delle operazioni selvicolturali o delle attività agroforestali, utilizzazione di boschi cedui, ecc;
- comparto agricolo: residui colturali provenienti dall'attività agricola e dalle colture dedicate di specie lignocellulosiche, piante oleaginose, per l'estrazione di oli e la loro trasformazione in biodiesel, piante alcoligene per la produzione di bioetanolo;
- comparto zootecnico: reflui zootecnici per la produzione di biogas;
- comparto industriale: residui provenienti dalle industrie del legno o dei prodotti in legno e dell'industria della carta, nonché residui dell'industria agro-alimentare;
- rifiuti urbani: residui delle operazioni di manutenzione del verde pubblico e frazione umida di rifiuti solidi urbani.

A seguito di quanto detto, i 52 campioni raccolti nell'ambito del Progetto BioRivaluta possono essere suddivisi in due categorie principali: residui lignocellulosici (specie erbacee e legnose) e residui alcoligeni (colture amidacee e prodotti ortofrutticoli). In base alla loro

composizione polisaccaridica (cellulosa, emicellulosa ed amido), l'unità di ricerca del DAFNAE ha quantificato nel corso del Progetto BioRivaluta il potenziale di etanolo ottenibile da ciascun sottoprodotto o residuo agro-alimentare (Tabella 4.1).

<b>Scarti e sottoprodotti agroindustriali</b>	<b>Sostanza secca (%)</b>	<b>Proteina (%)</b>	<b>Cellulosa (%)</b>	<b>Emicellulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Amido (%)</b>	<b>EtOH teorico ottenibile/residuo umido (Kg/t)</b>
Farinaccio di riso	88,6	13,9	4,6	12,4	2,8	26,5	152,30
Riso rotto	88,1	8,3	0,2	0,5	0,0	77,7	384,60
Riso macchiato	87,9	8,0	0,1	0,9	0,0	84,6	416,86
Grana verde di riso	87,9	9,9	1,8	3,7	0,0	68,6	345,52
Scarto di lavorazione di patate	8,3	11,9	3,4	1,7	1,0	49,2	24,30
Paglia di frumento	91,6	2,3	31,2	41,8	6,4	n.d.	n.d.
Paglia di orzo	91,5	3,4	44,9	33,2	6,7	n.d.	n.d.
Lolla riso	89,8	3,4	38,4	16,3	16,7	6,9	210,38
Tralci di vite (Valpolicella)	79,2	3,9	41,7	20,0	16,8	0,9	172,60
Potatura di olivo	75,0	8,5	19,8	16,4	16,6	1,7	82,70
Tralci di vite (Garganega)	74,0	5,3	38,2	20,3	16,9	n.d.	184,80
Sansa di olive	53,5	5,0	35,1	19,3	25,6	0,1	96,20
Vinaccia dolce non fermentata d'uva bianca	41,3	11,0	12,2	8,4	33,6	0,9	28,00

Potature di <i>Cupressocyparis x leylandii</i>	39,5	7,5	24,3	11,3	20,8	n.d.	n.d.
Vinaccia fermentata d'uva rossa	35,7	13,9	14,7	12,3	31,6	0,9	28,50
Vinaccia bianca con raspi	34,7	9,6	14,1	7,9	22,0	1,1	n.d.
Sansa di olive denocciolata	34,2	11,3	10,2	14,6	19,6	0,2	18,10
Paglia di riso	29,0	4,3	31,5	25,6	3,2	n.d.	46,60
Potatura verde di Cabernet-Sauvignon	26,9	8,1	27,7	15,5	14,3	1,2	n.d.
Raspi d'uva	25,9	5,5	19,4	11,7	15,9	1,0	10,53
Potatura verde di Chardonnay	21,2	11,8	24,4	12,8	16,8	n.d.	n.d.
Soia	85,2	5,0	39,3	15,2	15,9	n.d.	n.d.
Pianta di pomodoro sotto serra	28,1	15,5	24,2	12,1	9,1	n.d.	43,30
Bacelli di fagioli borlotti	21,6	5,5	33,7	10,8	3,8	n.d.	37,20
Scarto di fagiolini-cornette	21,6	15,2	28,2	11,9	7,8	n.d.	31,10
Tabacco per produzione seme per oli carburanti	21,4	12,4	27,8	12,3	10,6	n.d.	n.d.
Foglie e colletti di barbabietola da zucchero	20,9	12,4	13,3	16,4	3,1	n.d.	30,87
Pianta di melanzana sotto serra	20,0	15,1	25,1	10,9	11,7	1,2	26,90
Tabacco coltivato per biomassa	19,9	12,1	30,4	14,3	9,7	n.d.	30,87

Pianta di peperone sotto serra	18,0	14,6	20,9	10,9	13,3	0,8	19,90
Scarto di passatrice di pera	30,3	3,1	30,2	25,6	20,4	n.d.	46,60
Scarto di passatrice di pomodoro da industria	21,8	16,7	16,4	10,5	31,0	0,7	19,10
Scarto di passatrice di pesche nettarine	20,8	7,2	17,6	9,2	12,6	n.d.	18,70
Frutti di <i>Prunus pissardi</i> Nigra	19,5	4,9	24,5	10,6	15,8	n.d.	n.d.
Pera integra	17,5	2,4	9,3	6,0	5,3	n.d.	n.d.
Sansa di albicocche	17,0	7,2	16,0	7,1	10,1	n.d.	13,90
Albicocche intere	16,3	7,0	17,3	8,4	7,9	n.d.	14,40
Scarto di prugne	14,5	6,4	15,7	7,3	10,2	0,0	11,70
Scarto di mele per industria (varietà rosse)	12,6	2,9	5,4	2,9	2,8	n.d.	3,40
Scarto di lavorazione di radicchio: foglie di radicchio integre	11,9	19,0	13,0	5,0	4,0	0,1	8,00
Scarto di mele per industria (varietà gialle)	11,1	2,9	6,0	3,1	3,8	n.d.	3,40
Cipolla di scarto	11,1	10,9	6,2	2,5	0,4	0,3	3,70
Pesche nettarine di scarto	10,2	6,9	14,7	7,3	10,2	n.d.	7,70
Scarto misto frutta e verdura	9,9	7,5	13,9	4,4	2,5	n.d.	7,00

Melanzana da consumo	8,2	14,5	19,0	13,7	3,5	0,7	8,20
Cavolo cinese per commercializzazione	7,7	16,6	13,9	4,5	1,4	0,2	5,50
Melone di scarto	6,7	14,8	18,3	3,5	5,6	n.d.	6,30
Zucchine	5,9	28,6	13,0	4,4	2,0	0,8	4,20
Cetrioli di scarto	5,7	18,2	16,3	5,6	1,8	0,3	4,80
Pomodoro da consumo	5,6	20,4	17,9	4,6	7,4	0,1	5,10
Scarto di lavorazione di radicchio: foglie di radicchio triturate	5,5	15,8	18,3	7,2	7,9	0,0	5,52
Pomodoro da industria	2,5	17,5	12,5	3,3	7,6	0,3	1,70

**Tabella 4.1** Composizione chimico-strutturale dei campioni di sottoprodotti e residui censiti in BioRivaluta e quantità di bioetanolo potenzialmente ottenibile da tali biomasse. La diversa tipologia di matrice vegetale viene evidenziata con il colore arancione per il substrato amidaceo, blu per i substrati legnocellulosici e residuali provenienti da scarti di lavorazioni, coltivazioni di cereali e altri seminativi, rosso per il substrato erbaceo e verde per il substrato ortofrutticolo. Alcuni parametri sono stati determinati (n.d.).

Dalla analisi dei risultati riportati in Tabella 4.1, è emerso che alcuni sottoprodotti, come quelli della lavorazione dell'ortofrutta, presentano una sostanziale differenza di contenuto in sostanza secca, cellulosa, emicellulosa o lignina rispetto a quelli integri. Per esempio, si può considerare la componente lignina nel caso del pomodoro da consumo e dello scarto di passatrice di pomodoro da industria che ne contengono, rispettivamente, 7,4% e 31%. Anche la componente cellulosa è presente con contenuti molto differenti nella pera integra e negli scarti di passatrice di pera (rispettivamente, 9,3% e 30,2%). Prendendo invece in considerazione la sostanza secca, le pesche nettarine di scarto e gli scarti di passatrice di pesche nettarine sono caratterizzate da valori ben diversi, rispettivamente, 10,3% e 20,8%.

Dal momento che la composizione chimica della biomassa influenza in modo particolare il suo impiego ai fini della conversione in bioetanolo, la differenza suddetta potrebbe essere interessante. Per esempio, un contenuto inferiore di lignina gioverebbe all'efficacia del processo produttivo se si pensa che può dare origine alla formazione di inibitori in seguito ai pretrattamenti della biomassa, provoca un effetto diluizione (Ladisich *et al.*, 2010), causa l'adsorbimento delle cellulasi formando un complesso enzima-lignina non produttivo e quindi richiede un carico di enzima superiore e limita l'accessibilità degli enzimi alla cellulosa (Chen *et al.*, 2006). Lo stesso vale per un maggior contenuto di cellulosa in quanto si potrebbero ottenere più alte rese di saccharificazione e fermentazione per unità di peso umido.

Il contenuto medio (CM) di sostanza secca, calcolato considerando tutti i 52 campioni di scarti e residui agro-alimentari raccolti ed analizzati, è risultato del 33%. Come mostrato in Tabella 4.2, CM di sostanza secca varia tuttavia in modo considerevole a seconda della diversa tipologia di matrice vegetale presa in esame. Il contenuto medio di sostanza secca più alto è quello riconducibile agli scarti prevalentemente amidacei (72,1%), seguiti poi dai substrati lignocellulosici (52,7%) fino a scendere sensibilmente nel caso delle matrici erbacee ed ortofrutticole (Tabella 4.2).

Prendendo in considerazione tutti gli scarti, il contenuto medio totale di cellulosa è di 19,8%. Come atteso, i substrati lignocellulosici presentano il maggior contenuto di cellulosa con una percentuale media che si attesta attorno al 27,4%. Elevate quantità di cellulosa sono state evidenziate anche nel caso dei residui erbacei mentre le biomasse ortofrutticole ed amidacee presentano poca cellulosa.

<b>Tipologia di matrice vegetale</b>	<b>CM sostanza secca (%)</b>	<b>CM proteina (%)</b>	<b>CM cellulosa (%)</b>	<b>CM emicellulosa (%)</b>	<b>CM lignina (%)</b>	<b>CM amido (%)</b>
Amidacea	72,1	10,4	2,0	3,9	0,8	61,3
Lignocellulosica e residuale <sup>a</sup>	52,7	7,2	27,4	17,3	17,7	1,5
Erbacea	28,5	12,0	27,0	12,8	9,4	1,0
Ortofrutticola	12,4	11,4	15,3	7,1	7,9	0,3

<sup>a</sup>residuale: residui provenienti da scarti di lavorazioni, coltivazioni di cereali e altri seminativi

**Tabella 4.2** Determinazione del contenuto medio percentuale della sostanza secca e dei vari polimeri costituenti la biomassa calcolato in base alla ripartizione per tipologia di matrice vegetale.

Il contenuto medio totale di emicellulosa negli scarti è del 10,9%. Come per la cellulosa, la percentuale di emicellulosa risulta maggiore nelle biomasse lignocellulosiche e residuali (contenuto medio 17,3%). Seppur in misura minore, nei substrati erbacei è stata determinata una percentuale rilevante di emicellulosa (12,8%).

Il contenuto medio totale percentuale di lignina degli scarti è del 10,51%. Mentre nel substrato amidaceo la componente lignina risulta quasi assente, nella biomassa lignocellulosica e residuale si raggiunge il contenuto medio percentuale più alto (17,7%).

L'amido è principalmente presente nei cereali e nei tuberi di patate, infatti il maggior contenuto medio percentuale di amido è stato rilevato nella biomassa amidacea (61,3%). Dall'analisi chimica, è emerso che i substrati lignocellulosici e i prodotti ortofrutticoli contengono una percentuale di amido molto bassa che arriva fino al 1,7%, ad eccezione della lolla di riso (6,9%).

Il contenuto medio totale percentuale di proteina è di 10,1%. Considerando le quattro differenti matrici presentate in Tabella 4.2, il contenuto proteico è molto simile indipendentemente dalla natura del substrato analizzato. Il contenuto medio percentuale di proteina risulta simile in tutte le tipologie di substrati ad eccezione dei substrati

lignocellulosici e di quelli residuali (7,9%). Mentre cellulosa ed amido sono polisaccaridi i cui monomeri risultano essere fermentescibili da parte di *S. cerevisiae*, l'emicellulosa e la lignina non possono essere convertite in etanolo ad opera di questo microrganismo. In ogni caso, una volta valorizzata opportunamente tramite co-generazione, la lignina, caratterizzata da un'elevata densità energetica, potrebbe sostenere i requisiti energetici del processo di conversione ad etanolo. La proteina grezza invece può sostenere le esigenze nutrizionali del microrganismo deputato alla fermentazione dei residui selezionati. Inoltre, un elevato contenuto proteico del residuo post-fermentazione potrebbe ipotizzare l'impiego nel settore della mangimistica animale.

In base alle indagini analitiche eseguite, i substrati che sono risultati più interessanti per la produzione di bioetanolo sono quelli lignocellulosici perché hanno un'elevata percentuale di sostanza secca, cellulosa ed emicellulosa. In particolare, le paglie hanno il maggior contenuto in cellulosa (circa 39%), un considerevole contenuto di emicellulosa (circa 30%) e un basso livello di lignina (circa 5%). Rispetto al contenuto di lignina, come sopra descritto, questo tipo di biomasse rappresentano dei buoni candidati per la conversione in bioetanolo, poiché si suppone che il basso contenuto di lignina possa aumentare la velocità di idrolisi enzimatica (Chang *et al.*, 2000), diminuire l'adsorbimento delle cellulasi che impedisce la loro azione sulla cellulosa (Börjesson *et al.*, 2007) e ridurre il contenuto di inibitori a fine pretrattamento.

Sebbene la lignina sia generalmente ritenuta uno dei principali fattori limitanti l'idrolisi enzimatica, è stato recentemente dimostrato che anche il contenuto di emicellulosa influenza negativamente l'azione delle cellulasi (Mussatto *et al.*, 2008). La rimozione delle emicellulose incrementa la dimensione dei pori sul substrato aumentando l'accessibilità dell'enzima e la probabilità che idrolizzi la cellulosa (Chandra *et al.*, 2007). I componenti tra cui specialmente xilo-oligosaccaridi prodotti dall'idrolisi di emicellulosa inibiscono gli enzimi cellulasi (Yang *et al.*, 2004). Inoltre, a causa della diversità dei suoi zuccheri, l'emicellulosa richiede un'ampia gamma di enzimi per essere completamente idrolizzata in monomeri liberi (Limayem *et al.*, 2012). La frazione emicellulosica contiene principalmente zuccheri pentosi come D-xilosio e L-arabinosio e in risposta all'incapacità di fermentarli da parte del lievito *S. cerevisiae*, notevoli sforzi sono stati impiegati per sviluppare microrganismi geneticamente modificati che sono capaci di fermentare contemporaneamente zuccheri esosi e pentosi (Limayem *et al.*, 2012).

Nonostante le notevoli difficoltà nel convertire la lignocellulosa in biocarburanti, le biomasse lignocellulosiche stanno assumendo un'importanza sempre crescente dal momento che non sono in competizione con il settore alimentare e, al contrario della coltivazione di colture dedicate alla produzione di biomassa combustibile, riducono l'occupazione del suolo agricolo. Quest'ultimo non è un fattore di poco conto se consideriamo l'ipotesi di utilizzare in Italia il bioetanolo come biocarburante in sostituzione dei combustibili fossili, in cui Gelletti *et al.* (2006) preannuncia che si dovrebbero destinare alle colture alcoligene dedicate 6.000 000-7.000 000 ha di terreno agricolo, pari al 40% della SAU (Superficie Agricola Utilizzata) e al 20% dell'intero territorio nazionale.

I substrati selezionati riportano valori di conversione teorica in etanolo differenti: gli scarti della lavorazione di riso (ad esempio, lolla di riso, 210,38 Kg/t), i tralci di vite (184,80 Kg/t) e le potature (per esempio, potatura di olivo, 82,70 Kg/t) si caratterizzano per la più elevata potenzialità. Tuttavia, non sempre alla grande potenzialità del substrato corrisponde un'elevata produzione di etanolo, perché bisogna considerare la quantità di substrato disponibile nel territorio, la distribuzione e la stagionalità delle colture.

<b>Scarti e sottoprodotti agroindustriali</b>	<b>Saccarosio (g/Kg)</b>	<b>Glucosio (g/Kg)</b>	<b>Fruttosio (g/Kg)</b>	<b>Xilosio (g/Kg)</b>	<b>Ramnosio (g/Kg)</b>	<b>Arabinosio (g/Kg)</b>	<b>Cellobiosio (g/Kg)</b>	<b>Maltosio (g/Kg)</b>	<b>Zuccheri totali (g/Kg)</b>	<b>Zuccheri fermentescibili (g/Kg)</b>
<i>Farinaccio di riso</i>	16,79	16,83	9,82	NR	NR	0,17	NR	NR	43,61	43,44
<i>Riso rotto</i>	0,89	7,81	2,82	NR	NR	0,32	1,33	NR	13,17	11,52
<i>Riso macchiato</i>	1,72	10,97	5,58	NR	NR	0,18	1,21	NR	19,66	18,27
<i>Grana verde di riso</i>	0,55	5,04	3,97	0,04	NR	0,14	0,08	NR	9,82	9,56
<i>Scarto di lavorazione di patate</i>	0,70	12,38	11,40	NR	NR	NR	NR	0,05	24,52	24,52
<i>Paglia di frumento</i>	1,73	4,75	5,81	NR	0,28	0,79	NR	0,02	13,37	12,30
<i>Paglia di orzo</i>	2,26	4,37	2,80	0,02	NR	0,30	NR	NR	9,75	9,43
<i>Lolla di riso</i>	0,99	3,18	2,97	NR	NR	0,05	0,02	NR	7,21	7,14
<i>Tralci di vite (Valpolicella)</i>	0,35	1,37	1,04	NR	NR	0,03	NR	0,11	2,90	2,87
<i>Potatura di olivo</i>	5,10	5,86	2,88	0,01	NR	0,05	NR	NR	13,90	13,84

<i>Tralci di vite (Garganega)</i>	1,01	4,61	4,78	NR	NR	0,08	NR	0,15	10,63	10,55
<i>Sansa di olive</i>	3,00	1,19	2,74	0,03	0,72	0,90	NR	NR	8,58	6,93
<i>Vinaccia dolce non fermentata d'uva bianca</i>	2,17	38,13	29,58	NR	NR	NR	NR	0,24	70,13	70,13
<i>Potature di Cupressocyparis x leylandii</i>	n.d. <sup>b</sup>	0,47	n.d. <sup>b</sup>	NR	NR	0,39	NR	NR	0,86	0,47
<i>Vinaccia fermentata d'uva rossa</i>	2,92	2,79	1,30	NR	NR	0,09	NR	NR	7,10	7,01
<i>Vinaccia bianca con raspi</i>	3,28	51,98	47,85	NR	0,01	NR	NR	0,22	103,35	103,34
<i>Sansa di olive denocciolata</i>	2,77	2,49	2,71	0,02	NR	2,33	NR	0,15	10,48	8,13
<i>Paglia di riso</i>	4,93	6,45	4,15	NR	0,07	NR	3,86	NR	19,46	15,53
<i>Potatura verde di</i>	1,35	9,79	5,90	1,51	0,19	NR	NR	0,32	19,07	17,36

***Cabernet-Sauvignon***

<b><i>Raspi d'uva</i></b>	NR	16,66	17,28	NR	NR	NR	NR	0,09	34,03	34,03
<b><i>Potatura verde di Chardonnay</i></b>	2,04	13,74	6,06	1,26	0,22	NR	NR	0,47	23,80	22,31
<b><i>Soia</i></b>	1,66	2,85	1,39	NR	0,09	0,53	NR	NR	6,52	5,90
<b><i>Pianta di pomodoro sotto serra</i></b>	7,07	4,19	2,26	NR	0,08	0,12	0,05	NR	13,78	13,53
<b><i>Bacelli di fagioli borlotti</i></b>	1,88	0,72	1,31	0,02	NR	NR	2,19	0,79	6,91	4,70
<b><i>Scarto di fagiolini-cornette</i></b>	1,26	1,47	2,40	NR	NR	NR	0,10	NR	5,23	5,13
<b><i>Tabacco per produzione seme per oli carburanti</i></b>	0,80	1,61	3,65	0,07	0,87	0,22	0,02	NR	7,23	6,06
<b><i>Foglie e colletti di barbabietola da zucchero</i></b>	NR	NR	NR	0,03	NR	0,14	0,96	NR	1,12	NR
<b><i>Pianta di melanzana</i></b>	4,36	7,53	4,64	0,01	0,87	0,04	0,01	NR	17,46	16,53

*sotto serra*

<i>Tabacco coltivato per biomassa</i>	0,54	1,00	1,39	0,08	1,05	0,14	NR	NR	4,21	2,93
<i>Pianta di peperone sotto serra</i>	5,62	6,14	4,87	0,01	NR	0,36	0,60	0,56	18,16	17,18
<i>Scarto di passatrice di pera</i>	0,92	4,81	12,43	NR	NR	NR	0,50	0,08	18,74	18,24
<i>Scarto di passatrice di pomodoro da industria</i>	2,33	4,42	6,07	NR	NR	NR	1,50	0,06	14,39	12,88
<i>Scarto di passatrice di pesche nettarine</i>	2,61	31,35	31,26	NR	NR	2,54	1,27	NR	69,02	65,21
<i>Frutti di Prunus pissardi Nigra</i>	0,98	50,74	34,43	NR	17,82	NR	NR	NR	103,96	86,15
<i>Pera integra</i>	2,51	9,18	21,58	NR	NR	NR	NR	0,92	34,18	34,18
<i>Sansa di albicocche</i>	0,52	2,27	3,46	0,01	NR	NR	NR	NR	6,26	6,25
<i>Albicocche intere</i>	7,42	37,72	26,20	NR	NR	NR	NR	1,08	72,42	72,42

<i>Scarto di prugne</i>	1,69	59,74	30,19	NR	NR	0,45	NR	NR	92,06	91,61
<i>Scarto di mele per industria (varietà rosse)</i>	13,91	10,14	35,71	NR	NR	NR	NR	NR	59,75	59,75
<i>Scarto di lavorazione di radicchio: foglie di radicchio integre</i>	0,78	1,62	5,22	NR	NR	0,08	NR	0,02	7,72	7,64
<i>Scarto di mele per industria (varietà gialle)</i>	5,70	21,63	47,83	NR	NR	NR	NR	NR	75,16	75,16
<i>Cipolla di scarto</i>	6,07	17,60	16,94	NR	NR	NR	NR	NR	40,62	40,62
<i>Pesche nettarine di scarto</i>	22,71	16,88	15,20	NR	NR	0,34	NR	NR	55,13	54,79
<i>Scarto misto frutta e verdura</i>	0,81	8,93	11,97	NR	NR	0,02	NR	NR	21,73	21,71
<i>Melanzana da consumo</i>	1,38	14,63	13,72	0,94	NR	2,54	NR	NR	33,21	29,74
<i>Cavolo cinese per commercializzazione</i>	1,31	18,96	13,61	NR	NR	NR	NR	NR	33,88	33,88

<i>Melone di scarto</i>	0,41	7,77	11,10	NR	NR	NR	NR	0,05	19,33	19,33
<i>Zucchine</i>	0,81	10,64	11,88	0,01	NR	0,02	NR	NR	23,35	23,32
<i>Cetrioli di scarto</i>	0,82	5,56	5,62	NR	NR	NR	NR	NR	12,00	12,00
<i>Pomodoro da consumo</i>	1,64	12,15	12,79	NR	NR	NR	NR	0,04	26,61	26,61
<i>Scarto di lavorazione di radicchio: foglie di radicchio triturate</i>	0,41	1,59	3,26	0,01	NR	0,02	NR	NR	5,30	5,26
<i>Pomodoro da industria</i>	2,81	15,90	17,69	NR	NR	NR	0,46	0,09	36,95	36,49

<sup>a</sup>zuccheri fermentescibili= saccarosio, glucosio, fruttosio e maltosio; <sup>b</sup>n.d.= non determinato

**Tabella 4.4** Composizione degli zuccheri solubili estratti dai campioni tal quale di sottoprodotti agro-alimentari. Nell'ultima colonna è indicato il contenuto di zuccheri fermentescibili solubilizzati per chilogrammo di campione tal quale (g di zuccheri fermentescibili per Kg di peso umido).

Valutando i risultati ottenuti in seguito alle estrazioni di zuccheri semplici solubili dai sottoprodotti censiti (Tabella 4.4) risulta che gli zuccheri principalmente rilevati sono il saccarosio, il glucosio e il fruttosio, mentre tutti gli altri sono presenti in quantità trascurabili ad eccezione di alcuni prodotti vegetali quali patata verde di Cabernet-Sauvignon (xiloso, 1,51 g/Kg), frutti di *Prunus pissardi* Nigra (ramnosio, 17,82 g/Kg), scarto di passatrice di pesche nettarine (arabinosio, 2,54 g/Kg), paglia di riso (cellobiosio, 3,86 g/Kg) e albicocche intere (maltosio, 1,08 g/Kg).

In generale, i prodotti frutticoli sono più ricchi di zuccheri semplici solubili, difatti i campioni con la più alta concentrazione di zuccheri totali sono i frutti di *Prunus pissardi* Nigra (103,96 g/Kg), al contrario quelli con la più bassa concentrazione sono le patate di *Cupressocyparis x leylandii* (0,86 g/Kg). Nelle biomasse lignocellulosiche si è rilevato il più basso contenuto di zuccheri totali rilasciati, mentre in quelli amidacei un contenuto di zuccheri totali intermedio (farinaccio di riso, 43,61 g/Kg).

Sulla base dei risultati riportati in Tabella 4.4 e considerando esclusivamente gli zuccheri fermentescibili per *S. cerevisiae* (saccarosio, glucosio, fruttosio, maltosio), i campioni di maggior rilievo per la conversione in bioetanolo sono le vinacce (vinaccia bianca con raspi, 103,34 g/Kg), lo scarto di prugne (91,61 g/Kg), i frutti di *Prunus pissardi* Nigra (86,15 g/Kg), lo scarto di mele per industria con varietà gialla (75,16 g/Kg), le albicocche intere (72,42 g/Kg) e lo scarto di passatrice di pesche nettarine (65,21 g/Kg).

Si è ritenuto opportuno confrontare il contenuto in saccarosio, glucosio, fruttosio e maltosio, determinato nei campioni di BioRivaluta mediante l'analisi estrattiva descritta nel paragrafo 3.3, con il contenuto medio degli stessi zuccheri secondo quanto descritto, a parità di substrato, dal *National Nutrient Database for Standard Reference* realizzato da USDA (*United States Department of Agriculture*).

<b>Scarti e sottoprodotti agroindustriali</b>	<b>Saccarosio (g/100g)</b>	<b>Glucosio (g/100g)</b>	<b>Fruttosio (g/100g)</b>	<b>Maltosio (g/100)</b>
Lolla di riso	0,50 (0,10)	0,20 (0,31)	n.d. <sup>a</sup> (0,30)	n.d. <sup>a</sup> (0,00)
Riso rotto	0,21 (0,09)	0,11 (1,56)	0,02 (0,28)	0,00 (0,00)

Scarto di fagiolini-cornette	0,36 (0,13)	1,51 (0,21)	1,39 (0,24)	0,00 (0,00)
Pera integra	0,71 (0,25)	2,60 (1,19)	6,42 (2,16)	0,00 (0,09)
Albicocche intere	5,87 (0,74)	2,37 (2,20)	0,94 (2,62)	0,06 (0,11)
Scarto di prugne	1,57 (1,69)	5,07 (5,95)	3,07 (3,02)	0,08 (0,00)
Scarto di mele per industria (varietà rosse)	1,86 (1,39)	2,71 (1,13)	5,90 (3,57)	0,00 (0,00)
Scarto di mele per industria (varietà gialle)	2,07 (0,57)	1,87 (2,32)	6,10 (4,78)	0,00 (0,00)
Cipolle di scarto	0,99 (0,61)	1,97 (2,32)	1,29 (1,69)	0,00 (0,00)
Pesche nettarine di scarto	4,76 (2,27)	1,95 (2,46)	1,53 (1,52)	0,08 (0,00)
Scarto di lavorazione di patate	0,17 (0,07)	0,33 (1,61)	0,27 (1,14)	0,00 (0,00)
Melanzana da consumo	0,26 (0,14)	1,58 (1,84)	1,54 (1,37)	n.d. <sup>a</sup> (0,00)
Cavolo cinese per commercializzazione	0,08 (0,13)	1,67 (2,58)	1,45 (1,36)	0,01 (0,00)
Melone di scarto	4,35 (0,04)	1,54 (0,65)	1,87 (1,11)	0,04 (0,01)
Cetrioli di scarto	0,03 (0,08)	0,76 (0,67)	0,87 (0,56)	0,01 (0,00)
Pomodoro da consumo	0,00 (0,16)	1,25 (1,74)	1,37 (1,28)	0,00 (0,00)
Pomodoro da industria	0,00 (0,28)	1,25 (2,20)	1,37 (1,77)	0,00 (0,01)

---

<sup>a</sup>n.d.: non disponibile

**Tabella 4.5** Valori standard di zuccheri riportati nel *National Nutrient Database for Standard Reference*. Il contenuto in zuccheri è espresso in grammi per 100 grammi di prodotto tal quale. I valori indicati tra le parentesi rappresentano il contenuto in zuccheri determinato nei campioni di BioRivaluta.

Dal confronto proposto, si osserva che molti dei valori determinati a partire dai campioni BioRivaluta sono simili a quelli riportati dal *National Nutrient Database for Standard Reference* come il glucosio nelle albicocche intere (2,37, USDA e 2,20, campioni di BioRivaluta), mentre altri appaiono dissimili come il saccarosio nel melone di scarto (4,35, USDA e 0,04, campioni di BioRivaluta). Le condizioni pedo-climatiche del territorio, il tempo di raccolta, la *cultivar*, la disponibilità idrica, lo stadio di maturazione, la conservazione post-raccolta, rappresentano i principali fattori che possono influenzare il contenuto e la tipologia degli zuccheri presenti nel frutto e, quindi, potrebbero spiegare le differenze rilevate in Tabella 4.5.

Inoltre, è necessario sottolineare che i campioni censiti e studiati in questo lavoro di tesi derivano da sottoprodotti di lavorazione e non da derrate alimentari fresche destinate al consumo umano e/o animale.

#### **4.2 Disponibilità quantitativa di alcuni substrati lignocellulosici e zuccherini nell'ambito dell'aerale di BioRivaluta**

Nel presente lavoro di tesi, è stato possibile selezionare alcuni sottoprodotti agro-alimentari censiti nel corso del Progetto BioRivaluta per iniziare a definire quali metodi utilizzare per la loro conversione ad etanolo. La scelta di tali substrati è stata effettuata valutando il loro potenziale di conversione in bioetanolo sulla base dei risultati ottenuti e descritti nel paragrafo 4.1 e considerando anche la loro disponibilità quantitativa nell'areale di BioRivaluta. I substrati selezionati con i relativi dati sulla conversione in etanolo e disponibilità quantitativa sono riportati nella seguente Tabella 4.6.

<b>Scarti e sottoprodotti agroindustriali</b>	<b>Quantità di EtOH ottenibile/residuo umido (Kg/t)<sup>a</sup></b>	<b>Disponibilità (t in peso umido)</b>	<b>Etanolo potenzialmente ottenibile nell'areale di BioRivaluta (t)</b>
Lolla di riso	25,69	2200	56521,66
Tralci di vite	22,30	50000	1115170
Potatura di olivo	17,30	7200	124527
Sansa di olive	20,65	2760	57001,17
Sansa di olive denocciolata	9,07	1550	14053,06
Pianta di pomodoro sotto serra	18,48	7000	129328,20
Potatura verde di Cabernet-Sauvignon	22,65	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>
Scarto di passatrice di pesche nettarine	40,59	350	14205,26
Frutti di <i>Prunus pissardi</i> Nigra	54,24	1300	70506,11
Scarto di prugne	52,59	800	42067,74

<sup>a</sup>quantità di etanolo calcolata considerando polisaccaridi (amido e cellulosa) e zuccheri semplici (saccarosio, glucosio, fruttosio e maltosio); <sup>b</sup>n.d.: non disponibile

**Tabella 4.6** Quantità di materie prime per la conversione in bioetanolo offerte dal territorio Veneto che sono state selezionate per condurre gli esperimenti in questa tesi.

Osservando i valori di bioetanolo potenzialmente ottenibile nell'areale di BioRivaluta, le matrici più importanti sono i tralci di vite (1115170 t) e le piante di pomodoro sotto serra (129328,20 t) per quanto riguarda i residui lignocellulosici, mentre i frutti di *Prunus pissardi*

Nigra (70506,11 t) per i residui alcoligeni.

Le matrici zuccherine, in realtà, non garantiscono un quantitativo costante negli anni, perché la quantità disponibile dipende da differenti parametri e fattori: produzione annuale, eventuali anomalie di mercato, insorgenza di fisiopatie e dalla loro severità, che a loro volta dipendono dalle condizioni climatiche annuali non prevedibili. Inoltre, il considerevole contenuto di sostanze zuccherine e l'alto contenuto di umidità causano grossi problemi per lo stoccaggio della biomassa ortofrutticola raccolta, vista la facilità con cui vanno in contro a fenomeni fermentativi e di putrefazione. Dal punto di vista tecnologico, invece, la conversione dei prodotti frutticoli rispetto a quelli lignocellulosici risulta più semplice poiché non è necessario pretrattare con metodi chimici e/o enzimatici le materie prime e il contenuto di zuccheri semplici solubili è elevato.

Riguardo ai substrati lignocellulosici, i dati riportati in Tabella 4.6 sono promettenti. Tuttavia, la possibilità di utilizzare questi substrati come materia prima è spesso limitata dalla bassa resa e dall'elevato costo del processo di idrolisi basato sulle tecnologie attuali (John *et al.*, 2011), come gli elevati costi di pretrattamento (consumo energetico; costi notevoli per l'acquisto di complessi enzimatici e di solventi), lo smaltimento delle acque reflue, la corrosione dei componenti dell'impianto, l'utilizzo di condizioni operative critiche (temperatura, pressione) e il riuso e/o recupero dei sottoprodotti derivati dalla conversione. Un altro limite è rappresentato dal costo di approvvigionamento di tali residui: prezzo di vendita (se esiste un mercato definito), costo per la raccolta direttamente sul campo, trasporto, stoccaggio.

Come riportato in un lavoro dell'International Energy Agency del 2010, i costi di approvvigionamento aumentano al crescere delle dimensioni di un impianto di biocarburanti che incrementa la domanda annua di biomassa (circa 600 000 t/anno per un grande impianto commerciale). L'incremento dei costi dipende dalla dispersione della materia prima e, quindi, dalla difficoltà dei produttori di energia nel reperire la biomassa di scarto in quantità tali da giustificare l'esistenza di un impianto di biocarburanti.

Inoltre, quando si utilizzano i residui agricoli e/o forestali come materie prime per la produzione di biocarburanti di seconda generazione, la loro densità di massa è più bassa (0,1 t/m<sup>3</sup> di sostanza secca per la paglia e 0,2-0,3 t/m<sup>3</sup> di sostanza secca per i frammenti legnosi)

rispetto alle materie prime per la produzione di biocarburanti di prima generazione (ad esempio, colture amidacee, oleaginose e zuccherine) facendo aumentare ulteriormente i costi di fornitura della biomassa. Visto che il contenuto di umidità della biomassa influenza anche i costi di approvvigionamento, la biomassa essiccata potrebbe ridurre significativamente i costi di trasporto (AIE, 2008).

### **4.3 Prove di saccarificazione sulle biomasse lignocellulosiche selezionate**

Diverse prove di saccarificazione sono state eseguite al fine di convertire in modo efficiente i substrati selezionati in zuccheri fermentescibili (paragrafo 4.2), utilizzando due diverse miscele commerciali di cellulasi normalmente impiegate negli impianti di produzione del bioetanolo a partire da differenti matrici lignocellulosiche: NS50012 e AlternaFuel CMAX.

I due cocktail enzimatici sono stati innanzitutto valutati per la loro capacità di idrolizzare substrati di laboratorio quali l'amido solubile, la carbossimentilcellulosa (CMC) e lo xilano. Nel saggiare la loro attività enzimatica sono stati considerati due valori di pH, ovvero quelli descritti come ottimali: pH 5,0 per il cocktail NS50012 e pH 6,0 per il cocktail AlternaFuel CMAX.

Come mostrato in Tabella 4.7, il complesso enzimatico AlternaFuel CMAX risulta più efficiente del NS50012 per quanto riguarda l'idrolisi dei substrati modello CMC e xilano. In particolare, riferendoci ad AlternaFuel CMAX, i valori più alti di idrolisi enzimatica si rilevano nelle condizioni di pH 6,0. Nonostante tra gli enzimi che costituiscono i due cocktail enzimatici, indicati in Tabella 3.3, non vengano menzionati enzimi appartenenti al gruppo delle amilasi, i risultati del saggio enzimatico rivelano la loro presenza anche se in basse quantità (Tabella 4.7). Relativamente ai loro valori ottimali di pH e anche se le differenze sono minime, il cocktail enzimatico NS50012 mostra un contenuto di amilasi superiore ad AlternaFuel CMAX.

Complesso enzimatico	Amido solubile (U/mL)		CMC (U/mL)		Xilano (U/mL)	
	pH 5,0	pH 6,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 5,0	pH 6,0
NS50012	0,13 ± 0,01	0,07 ± 0,02	14,23 ± 0,01	10,03 ± 0,01	4,88 ± 0,02	21,23 ± 0,04
AlternaFuel CMAX	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	32,90 ± 0,01	33,65 ± 0,02	27,54 ± 0,07	31,57 ± 0,04

**Tabella 4.7** Determinazione dell'attività enzimatica di NS50012 e AlternaFuel CMAX secondo il metodo descritto da Miller (1959) ed espressa in millimoli di glucosio o xilosio rilasciate per millilitro per minuto. I dati riportati rappresentano i valori medi di tre repliche incluse le deviazioni standard.

Come descritto in Materiali e Metodi, paragrafo 3.5, l'idrolisi enzimatica è stata condotta su alcuni campioni lignocellulosici, quali sansa di olive, sansa di olive denocciolata, piante di pomodoro sotto serra, lolla di riso, potatura di olivo, potatura verde di Cabernet-Sauvignon e tralci di vite, utilizzando una concentrazione di substrato pari al 10% di peso secco e due complessi enzimatici per ciascun substrato (0,4% di peso/peso secco substrato, NS50012 e 2,5% di g enzima/g cellulosa, AlternaFuel CMAX). In Figura 4.1 vengono riportate le cinetiche di saccarificazione in cui sono descritte le quantità di glucosio e di altri zuccheri semplici (xiloso, arabinoso, ramnosio, mannosio, cellobiosio e maltosio) rilasciati durante l'idrolisi enzimatica dei substrati selezionati.

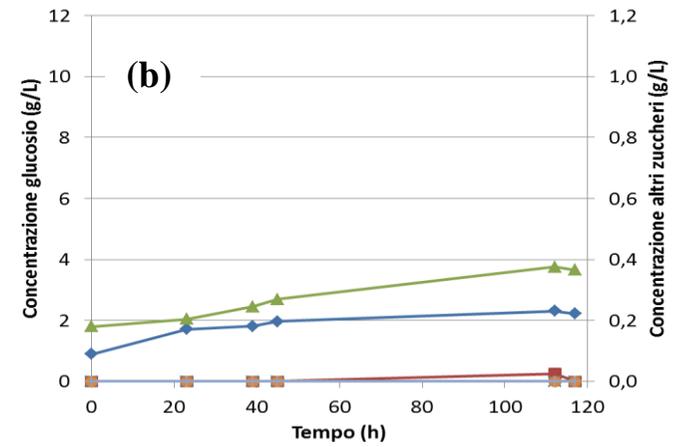
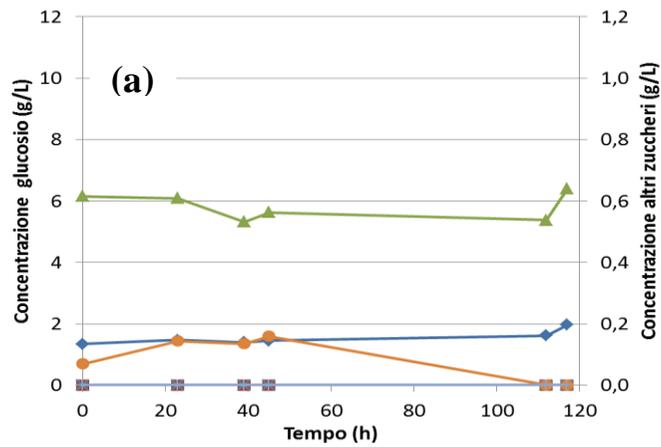
Sui tralci di vite è stata condotta una prova di saccarificazione raddoppiando la dose enzimatica di AlternaFuel CMAX (5%, g enzima/g cellulosa). Di fatto, la dose al 5% ha liberato più glucosio ma non ne ha raddoppiato la concentrazione rispetto al 2,5%, di conseguenza la dose al 5% comporta uno spreco di enzima e un costo di produzione più alto senza ottenere un grande beneficio.

◆ Glucosio (g/L) ■ Xilosio (g/L) ▲ Arabinosio (g/L) ✕ Ramnosio (g/L) ✱ Mannosio (g/L) ● Cellobiosio (g/L) + Maltosio (g/L)

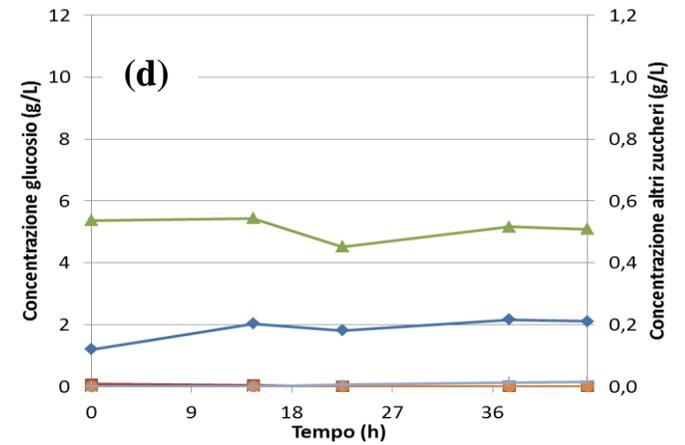
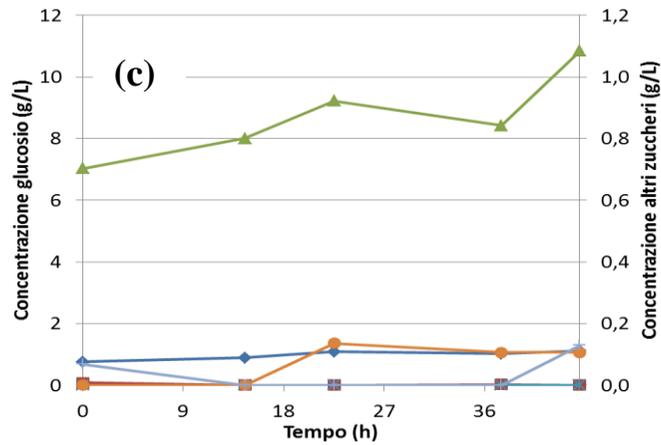
**NS50012**

**AlternaFuel CMAX**

**Sansa di olive**



**Sansa di olive denocciolata**

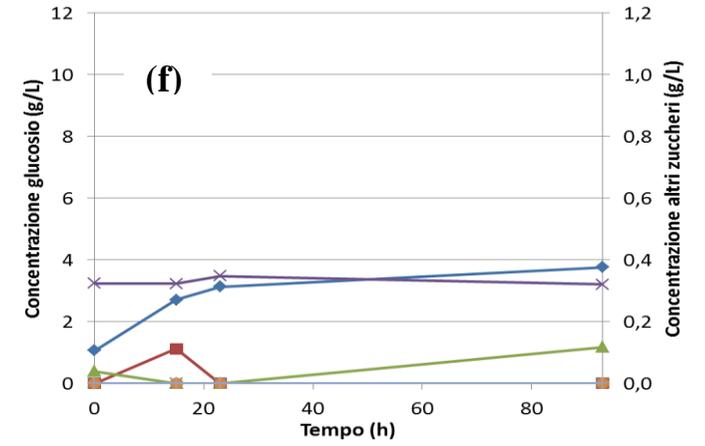
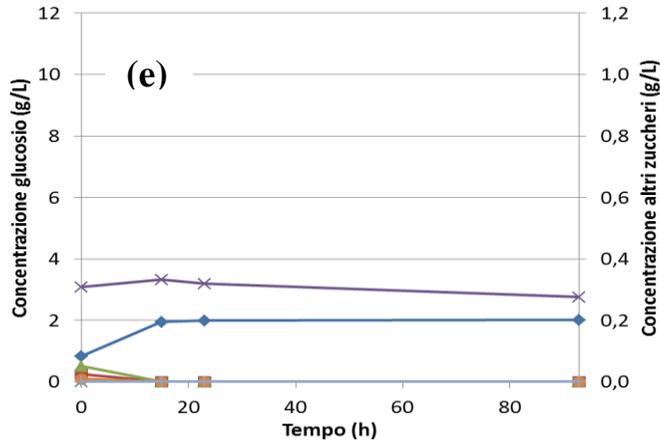


**NS50012**

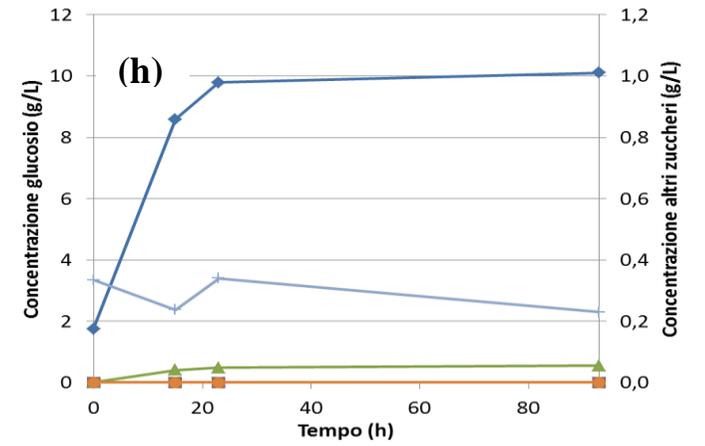
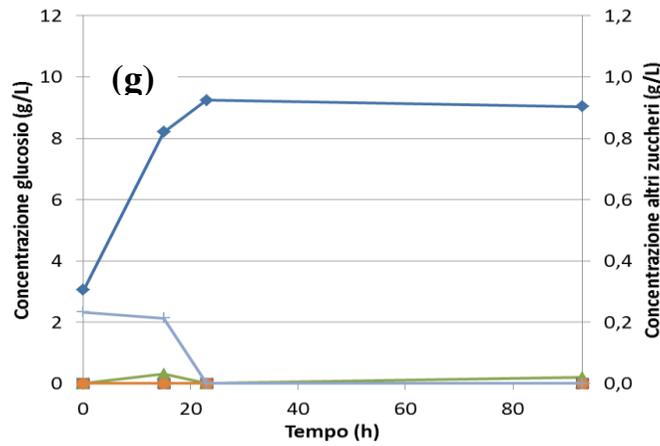
**AlternaFuel CMAX**

◆ Glucosio (g/L) ■ Xilosio (g/L) ▲ Arabinosio (g/L) ✕ Ramnosio (g/L) ✧ Mannosio (g/L) ● Cellobiosio (g/L) + Maltosio (g/L)

**Pianta di pomodoro sotto serra**



**Lolla di riso**

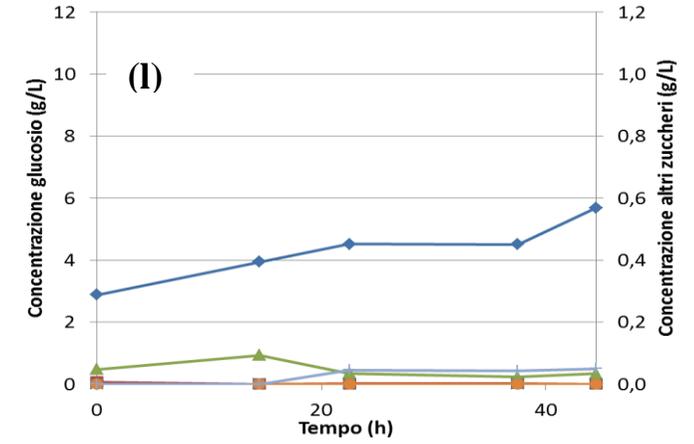
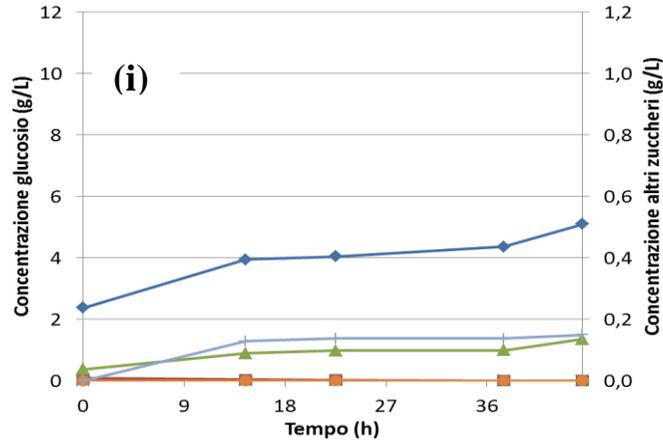


**NS50012**

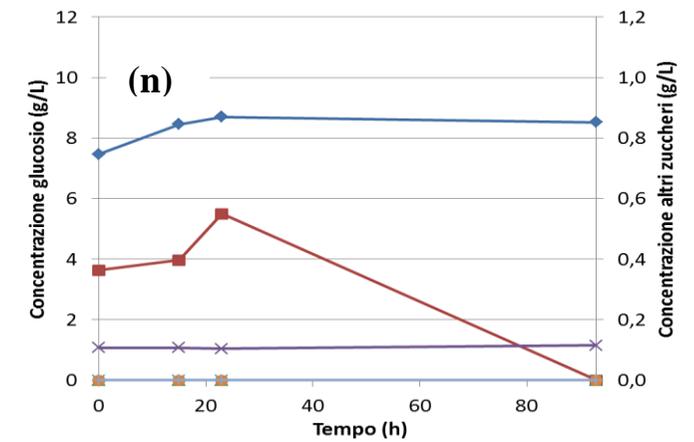
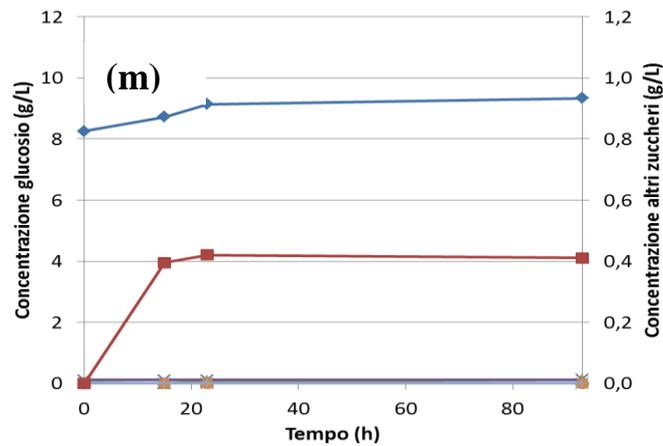
**AlternaFuel CMAX**

◆ Glucosio (g/L) ■ Xilosio (g/L) ▲ Arabinosio (g/L) ✕ Ramnosio (g/L) \* Mannosio (g/L) ● Cellobiosio (g/L) ◆ Maltosio (g/L)

**Potatura di olivo**



**Potatura verde di Cabernet-Sauvignon**

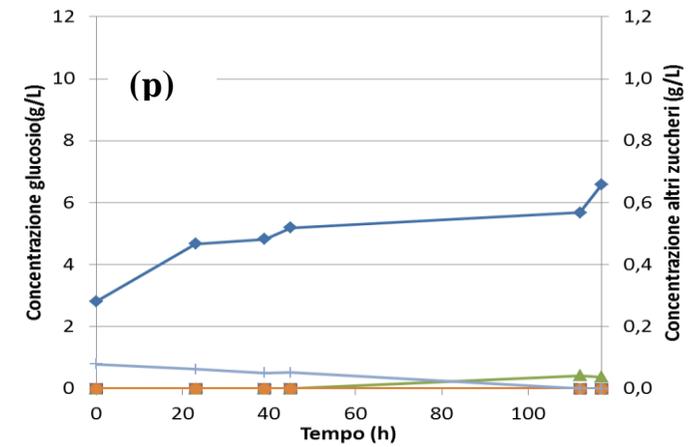
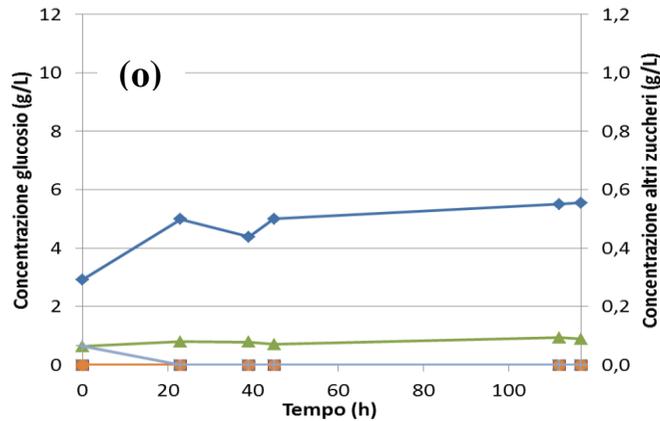


**NS50012**

**AlternaFuel CMAX**

◆ Glucosio (g/L) ■ Xilosio (g/L) ▲ Arabinosio (g/L) ✕ Ramnosio (g/L) ✱ Mannosio (g/L) ● Cellobiosio (g/L) + Maltosio (g/L)

**Tralci di vite**



**Figura 4.1** Andamento della concentrazione di glucosio (asse principale delle ordinate) e di altri zuccheri (asse secondario delle ordinate), espressi in g/L, durante il processo di saccharificazione utilizzando due cocktail enzimatici (NS50012 e AlternaFuel CMAX) per ciascun substrato selezionato in base alle sue caratteristiche compositive: sansa di olive (a, b), sansa di olive denocciolata (c, d), pianta di pomodoro sotto serra (e, f), lolla di riso (g, h), potatura di olivo (i, l), potatura verde di Cabernet-Sauvignon (m, n) e tralci di vite (o, p).

Tra i prodotti di idrolisi, il glucosio è quello presente in concentrazioni più elevate in tutti i substrati lignocellulosici saccarificati. Riguardo al complesso enzimatico NS50012, la concentrazione di glucosio più alta è stata rilasciata dalla potatura verde di Cabernet-Sauvignon (9,34 g/L), invece riguardo ad AlternaFuel CMAX la concentrazione di glucosio più alta è stata registrata nella lolla di riso (10,10 g/L). Entrambi i substrati raggiungono la massima concentrazione di glucosio dopo 93 ore.

Nella maggior parte dei substrati esaminati, dopo poche ore di incubazione viene raggiunta una concentrazione di glucosio elevata che si stabilizza fino al termine della prova di saccarificazione come nel caso della potatura verde di Cabernet-Sauvignon (glucosio, 9,14 g/L, dopo 23 ore; glucosio 9,34 g/L, dopo 93 ore). Riferendosi, rispettivamente, a *feedstock* lignocellulosici in generale e a prove di saccarificazione condotte sulla paglia di mais, Mussatto *et al.* (2008) e Smith *et al.* (2010) hanno riportato che la velocità di reazione enzimatica è elevata nelle prime 24 ore di incubazione, dopodiché può rallentare. Questo comportamento avviene probabilmente perché gli enzimi cellulolitici degradano immediatamente la frazione amorfa più accessibile della cellulosa. Poi con il progredire della reazione, la cellulosa diventa sempre più resistente ad ulteriore idrolisi a causa di un incremento del suo grado cristallino (Mussatto *et al.*, 2008).

Gli altri zuccheri determinati sono presenti in quantità minori, in tracce o sono assenti. Lo xilosio è presente in quantità trascurabili o assente nella maggior parte dei substrati tranne che nelle piante di pomodoro sotto serra (0,11 g/L) e nella potatura verde di Cabernet-Sauvignon (0,42 g/L con NS50012 e 0,55 g/L con AlternaFuel CMAX). La quantità di arabinosio è bassissima in tutti i substrati ad eccezione della potatura verde di Cabernet-Sauvignon in cui è assente per entrambi i complessi enzimatici. Tra questi zuccheri, l'arabinosio è l'unico la cui quantità superare l'unità come il caso della sansa di olive denocciolata (1,08 g/L con NS50012). Il ramnosio è assente in tutti i substrati eccetto che nelle piante di pomodoro sotto serra (0,33 g/L NS50012, 0,35 g/L AlternaFuel CMAX) e nella potatura verde di Cabernet-Sauvignon (0,12 g/L AlternaFuel CMAX). Il mannosio è il solo zucchero a non essere stato rilevato in nessuno dei substrati analizzati, mentre il cellobiosio è stato rilevato solo nei substrati sottoposti all'azione del cocktail enzimatico NS50012: sansa di olive (0,16 g/L) e sansa di olive denocciolata (0,14 g/L). Infine, il maltosio è presente nella maggior parte dei substrati in quantità comprese tra 0 e 0,34 g/L.

Considerato che un'elevata efficienza di idrolisi, e quindi depolimerizzazione di cellulosa ed emicellulosa presenti nelle biomasse lignocellulosiche, è essenziale per garantire la sostenibilità economica della produzione di etanolo (Saha *et al.*, 2005), ulteriori esperimenti sono necessari affinché la concentrazione di questi zuccheri possa essere incrementata.

La differenza nell'efficienza di idrolisi tra i due complessi enzimatici utilizzati (NS50012 e AlternaFuel CMAX) emerge in particolar modo in tre substrati quali pianta di pomodoro sotto serra, sansa di olive denocciolata e tralci di vite, in cui il glucosio rilasciato quando i substrati sono trattati con AlternaFuel CMAX è di circa il 40-50% in più rispetto a quello liberato quando i substrati sono trattati con NS50012. Queste considerazioni sono confermate dal grado di saccarificazione ottenuto con i due cocktail enzimatici a partire dai sette substrati indicato in Tabella 4.8.

Scarti e sottoprodotti agroindustriali	Resa di saccarificazione (%)	
	NS50012	AlternaFuel CMAX
Sansa di olive	5	6
Sansa di olive denocciolata	10	19
Pianta di pomodoro sotto serra	7	13
Lolla di riso	22	24
Potatura di olivo	23	26
Potatura verde di Cabernet-Sauvignon	30	28
Tralci di vite	12	19

**Tabella 4.8** Resa di saccarificazione espressa come percentuale della resa teorica calcolata nei substrati lignocellulosici saccarificati, secondo la formula descritta al paragrafo 3.5 di Materiali e Metodi.

Come atteso, le differenze tra le diverse rese di saccarificazione non sono elevate. I substrati lignocellulosici trattati con il complesso enzimatico NS50012 presentano le più basse rese di saccarificazione, ad eccezione della potatura verde di Cabernet-Sauvignon con una percentuale del 30% e di altri matrici simili come la potatura di olivo (23%). Anche per AlternaFuel CMAX, le rese di saccarificazione più alte sono riconducibili alla potatura verde di Cabernet-Sauvignon (28%), alla potatura di olivo (26%) ma anche alla lolla di riso (24%).

Calcolando la media del grado di saccarificazione ottenuto per entrambi i cocktail enzimatici, il valore medio percentuale più alto si ottiene con il complesso AlternaFuel CMAX (19,3%) dimostrando quindi un'azione d'idrolisi più efficace sulle biomasse lignocellulosiche.

Valutando i risultati ottenuti, si può ipotizzare che i due cocktail enzimatici dimostrino la loro efficacia a seconda del substrato da trattare. Ciononostante il cocktail AlternaFuel CMAX si può considerare quello che complessivamente risulta più efficace con diversi substrati perché rispetto al cocktail NS50012 libera nella maggior parte dei casi una quantità superiore di zuccheri quali xilosio, arabinosio, maltosio e ramnosio (Figura 4.1).

Se confrontiamo la Tabella 4.1 con la Tabella 4.8 si nota che le biomasse saccarificate che hanno un simile contenuto in cellulosa possono dare risultati diversi in termini di produzione di glucosio e, conseguentemente, grado di saccarificazione. È il caso delle piante di pomodoro sotto serra e della potatura verde di Cabernet-Sauvignon che contengono, rispettivamente, 26,8% (GS 7% con NS50012 e 13% con AlternaFuel CMAX) e 27,7% (GS 30% con NS50012 e 28% AlternaFuel CMAX) di cellulosa. Tale differenza potrebbe essere attribuita al contenuto di lignina che può legarsi con gli enzimi e competere quindi con la cellulosa. Studi recenti hanno infatti dimostrato 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). In alternativa, il risultato ottenuto in questo lavoro di tesi potrebbe essere ascrivito ad una riduzione della reattività della cellulosa a causa di un cambiamento del suo stato di cristallinità e l'accessibilità della superficie (Smith *et al.*, 2010) visto che il contenuto di lignina è maggiore nel substrato che ha un grado di saccarificazione superiore come il caso della potatura verde di Cabernet-Sauvignon (lignina, 14,3 % e GS, 28,3%) rispetto alle piante di pomodoro sotto serra (lignina, 9,0% e GS, 12,6%).

Tra tutti i substrati idrolizzati, le potature (potatura verde Cabernet-Sauvignon e potature di olivo) con una resa di saccarificazione più alta risultano i substrati più interessanti per la conversione in bioetanolo. Al fine di migliorare ulteriormente l'efficienza di idrolisi enzimatica, tali substrati sono stati sottoposti ad un pretrattamento chimico-fisico per solubilizzare l'emicellulosa e favorire l'attacco degli enzimi alla cellulosa (vedi paragrafo 4.4).

#### **4.4 Prove di pretrattamento e saccarificazione su substrati lignocellulosici**

Il pretrattamento è un passaggio preliminare e necessario all'idrolisi delle biomasse lignocellulosiche in zuccheri fermentescibili per il fatto che l'idrolisi della cellulosa è ostacolata dalla natura chimico-fisica e strutturale dei reticoli di lignina ed emicellulosa (Alvira *et al.*, 2010). La scelta del tipo di pretrattamento ha un grande impatto su tutte le fasi successive dello schema di conversione in etanolo. Può infatti determinare la generazione di composti tossici potenzialmente inibitori per il lievito deputato alla fermentazione. Molto spesso, inoltre, richiede l'ausilio di strumentazioni per provvedere all'agitazione meccanica del materiale pretrattato (Galbe *et al.*, 2007; Sun and Cheng, 2002). Per di più, affinché il pretrattamento sia attuabile, è necessario che abbia un basso impatto dal punto di vista economico, energetico ed ambientale.

Nel presente lavoro di tesi, è stato scelto un pretrattamento con acido solforico diluito (come descritto in Materiali e Metodi, paragrafo 3.6) che è stato utilizzato per pretrattare due campioni, ovvero la lolla di riso e i tralci di vite. Secondo Alvira *et al.* (2010), questo tipo di pretrattamento può essere condotto in due maniere differenti: ad alte temperature (per esempio 180°C) per pochi minuti oppure a temperature più basse (per esempio 120°C) ma a tempi più lunghi (30-90 minuti). Per le prove seguenti sono state scelte delle condizioni *mild*, ovvero basse temperature e basse concentrazioni di acido, mirando ad ottenere un frazionamento delle componenti che costituiscono la fibra dei campioni scelti.

L'idrolisi enzimatica successiva alla fase di pretrattamento verrà condotta impiegando un basso dosaggio di enzimi, che rappresentano un aspetto importante nel costo totale del processo produttivo. La biomassa generalmente è costituita dal 20-30% di emicellulosa e 40-50% di cellulosa (Wyman, 2007), più specificatamente la lolla di riso e i

tralci di vite presentano, rispettivamente, 16,3% e 20,3% di emicellulosa e circa il 38% di cellulosa, pertanto una porzione importante, quella cellulosica, deve essere ridotta a monosaccaridi fermentabili in bioetanolo. Gli enzimi impiegati devono consentire di raggiungere alte concentrazioni di zuccheri durante la fase di idrolisi impiegando basse dosi di enzima, per rendere questo processo economicamente fattibile. In questa sperimentazione, il complesso enzimatico utilizzato è AlternaFuel CMAX, dal momento che ha dimostrato le più elevate *performances* di saccarificazione (Tabella 4.8).

Il pretrattamento è stato condotto con acido solforico a diverse concentrazioni (1 e 10% peso/peso secco del substrato), utilizzando una concentrazione di substrato pari al 10% di peso secco, ottenuta aggiungendo acqua deionizzata, e autoclavando a 121°C per 30 minuti. Successivamente, il pH della lolla di riso e dei tralci di vite pretrattati è stato corretto con NaOH (5 M), a valori ottimali per i due cocktail enzimatici, è stato aggiunto il complesso enzimatico (Tabella 3.5) e la sodio azide 0,02%. Poi, sono stati incubati alla temperatura di 55°C.

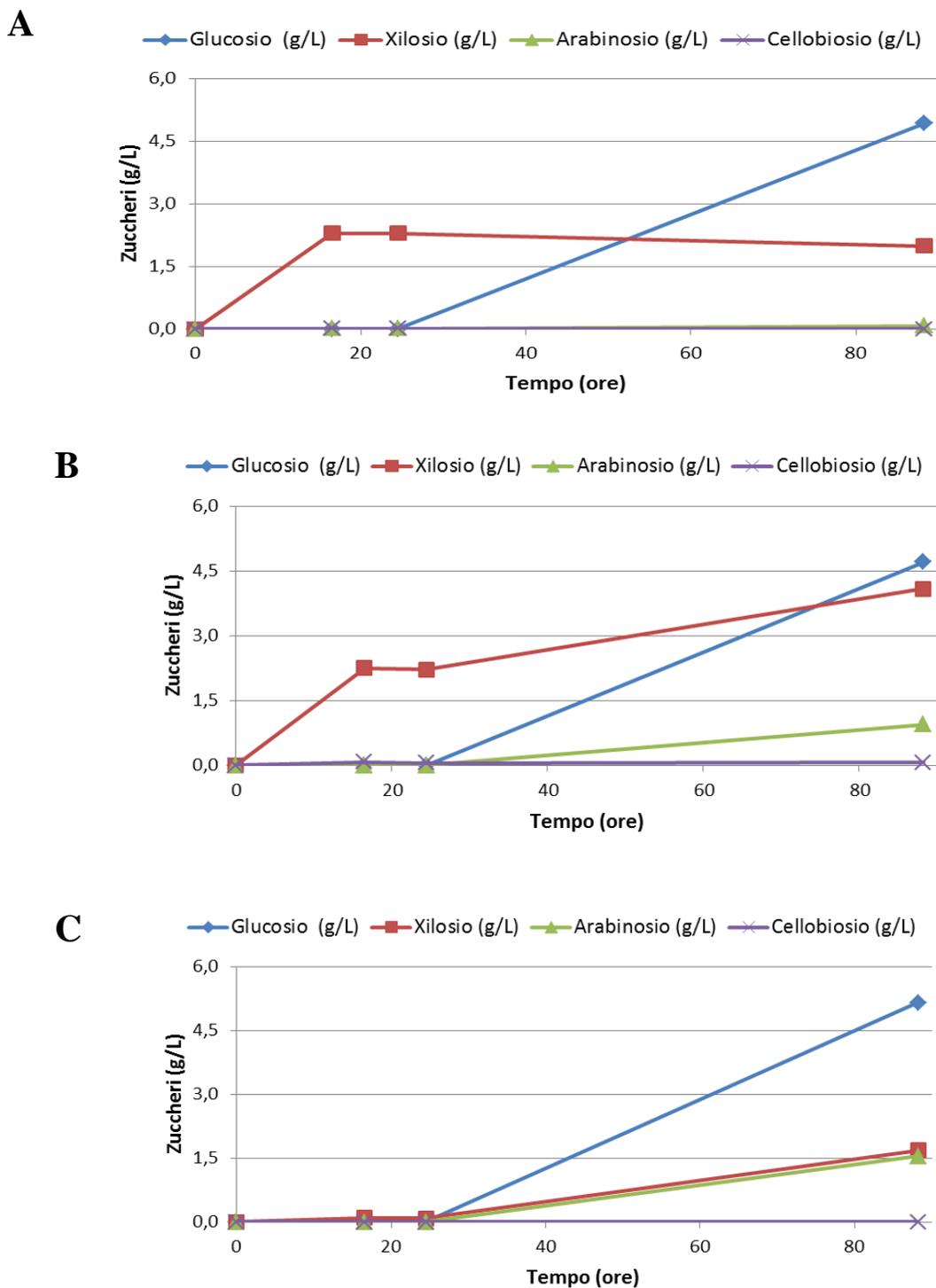
L'interesse di condurre tali prove su lolla di riso e tralci di vite, deriva dal loro elevato contenuto di cellulosa (circa 38%), dalla disponibilità quantitativa (56521,66 t, lolla di riso e 1115170 t, tralci di vite), dalle elevate potenzialità di conversione teorica in etanolo (210,38 Kg/t, lolla di riso e 184,80 Kg/t, tralci di vite) e dai risultati ottenuti nelle prime prove di saccarificazione condotte con AlternaFuel CMAX (10,10 g/L, lolla di riso e 8,68 g/L, tralci di vite).

La fase di pretrattamento con acido solforico ha portato all'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 il trattamento in autoclave, mentre l'imbrunimento del solido è dovuto all'alterazione della struttura reticolare della lignina che è catalizzata dagli acidi (Albergo *et al.*, 2013).

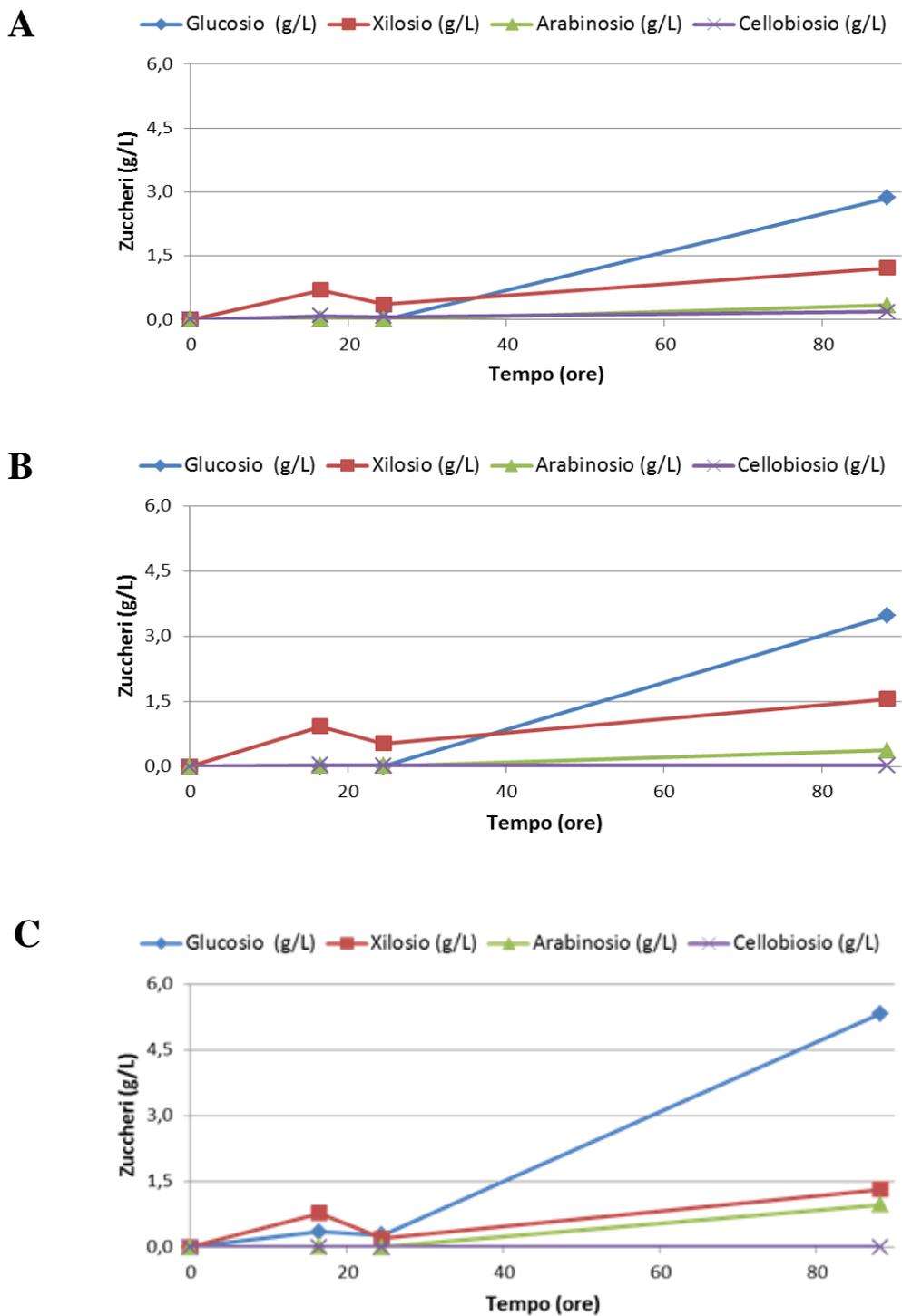
Dai grafici mostrati in Figura 4.2, si nota che il pretrattamento della lolla di riso con acido solforico 1% (p/p) favorisce, in seguito all'azione dell'AlternaFuel CMAX, una maggiore solubilizzazione della matrice emicellulosica con un più alto rilascio di xilosio (4,10 g/L) e arabinosio (0,94 g/L). La rimozione dell'emicellulosa aumenta il diametro dei pori del substrato aumentando la probabilità della cellulosa di essere idrolizzata (Chandra *et al.*, 2007),

riducendo inoltre la probabilità che le cellulasi rimangano intrappolate nei pori se l'area interna è più grande di quella esterna (Zhang *and* Lynd, 2004). Infatti, osservando le curve di saccarificazione sia della lolla di riso sia dei tralci di vite, si può constatare che la degradazione dei polimeri di emicellulose anticipa quella delle cellulose: mentre la concentrazione degli zuccheri xilosio e arabinosio, monomeri che costituiscono l'emicellulosa aumentano dopo circa 16 ore, i livelli del glucosio, monomero della cellulosa, iniziano ad aumentare dopo circa 88 ore (per esempio, Figura 4.2 a,b).

Nei tralci di vite, all'aumento della concentrazione di acido solforico (0, 1 e 10% di peso/peso secco del substrato) corrisponde un progressivo incremento della concentrazione di glucosio (da 2,86 a 5,34 g/L) e arabinosio (da 0,33 a 0,97 g/L) liberato dal processo di idrolisi ad opera del complesso AlternaFuel CMAX. Come nella lolla di riso, anche nei tralci di vite la quantità massima di xilosio si ottiene dal pretrattamento con acido solforico all'1% (p/p), anche se nei tralci di vite non si osserva una forte degradazione della frazione emicellulosica (4,10 g/L di xilosio, lolla di riso e 1,56 g/L di xilosio, tralci di vite) (Figura 4.2b e 4.3b).



**Figura 4.2** Prodotti di idrolisi ottenuti dalla saccarificazione della lolla di riso pretrattati in autoclave (121°C) per 30 minuti senza acido solforico (A), con acido solforico all'1% di peso su peso secco di substrato (B) e con acido solforico al 10% di peso su peso secco di substrato (C). I dati riportati derivano dalla media di due replicati.



**Figura 4.3** Prodotti di idrolisi ottenuti dalla saccarificazione dei tralci di vite pretrattati in autoclave (121°C) per 30 minuti senza acido solforico (A), con acido solforico all'1% di peso su peso secco di substrato (B) e con acido solforico al 10% di peso su peso secco di substrato (C). I dati riportati derivano dalla media di due replicati.

In entrambe i campioni, non si osserva un grande beneficio apportato dal pretrattamento con acido solforico in termini di resa di glucosio, nonostante la concentrazione di acido solforico sia aumentata da 0% al 10%. Confrontando le cinetiche di saccarificazione mostrate in Figura 4.1 con quelle in Figura 4.2 e 4.3, si nota come la lolla di riso e i tralci di vite pretrattati liberino una minore quantità di glucosio al termine della fase di idrolisi, ma si osserva anche un aumento considerevole degli zuccheri ottenuti dalla degradazione delle emicellulose. A carico dei tralci di vite è stata eseguita una prova di saccarificazione su substrato pretrattato raddoppiando la dose di AlternaFuel CMAX (5%, g enzima/g cellulosa). I risultati ottenuti non hanno dimostrato nessun vantaggio nel raddoppiare la dose enzimatica, ottenendo infatti valori di zuccheri fermentescibili del tutto simili a quelli registrati al termine dell'idrolisi enzimatica condotta con la dose di AlternaFuel CMAX del 2,5% (g enzima/g cellulosa).

Come indicato nel paragrafo 3.5, nella sezione Materiali e Metodi, il grado di saccarificazione è stato calcolato applicando l'Equazione 1 in cui è stata utilizzata la concentrazione di glucosio rilasciata dalle cellulasi durante le prove di saccarificazione condotte sulla lolla di riso e i tralci di vite pretrattati con una dose di AlternaFuel CMAX del 2,5% (g enzima/g cellulosa) (Tabella 4.9).

Scarti e sottoprodotti agroindustriali	Resa di saccarificazione (%)		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	0%	1%	10%
	(% peso/peso secco substrato)	(% peso/peso secco substrato)	(% peso/peso secco substrato)
Lolla di riso	12	11	12
Tralci di vite	6	8	12

**Tabella 4.9** Resa di saccarificazione espressa come percentuale della resa teorica calcolata nei substrati lignocellulosici saccarificati dopo averli pretrattati con acido solforico a diverse concentrazioni (0%, 1%, 10%).

Anche se con differenze minime fra i due substrati, la resa di saccarificazione più alta è stata rilevata nella lolla di riso (12,1%) pretrattata con la più alta concentrazione di acido solforico. Questo tipo di pretrattamento sembra avere effetto principalmente sui tralci di vite, visto che incrementando la concentrazione di acido solforico, si nota anche un incremento della resa di saccarificazione. Le medesime considerazioni, riportate nel paragrafo 4.3, a proposito della diversa resa di saccarificazione e simile contenuto di cellulosa (lolla di riso, 38,4% e tralci di vite, 38,2%) e lignina (lolla di riso, 16,7% e tralci di vite, 16,9%), valgono anche per i risultati ottenuti da questi substrati.

Dal confronto delle rese di saccarificazione ottenute pretrattando e non le matrici lignocellulosiche, Tabella 4.9 e 4.8 rispettivamente, si osserva che i risultati migliori si ottengono quando le matrici non vengono pretrattate (lolla di riso, 23,7% e tralci di vite, 19,4%). Un simile risultato sembrerebbe presupporre che il pretrattamento in autoclave influisca in modo negativo sulla capacità del complesso enzimatico AlternaFuel CMAX di saccarificare la cellulosa. Ulteriori sperimentazioni saranno necessarie per validare tale ipotesi. In alternativa all'acido solforico, è auspicabile l'impiego di altri pretrattamenti chimico-fisici per destrutturare la componente lignocellulosica dei substrati censiti nel corso di BioRivaluta e selezionati per il loro elevato potenziale di conversione in etanolo. Se si volesse proseguire la sperimentazione impiegando il pretrattamento con acidi diluiti, nel caso di materie lignocellulosiche, altri acidi sono stati già testati come l'acido cloridrico, l'acido fosforico e l'acido nitrico (Mosier *et al.*, 2005a) e, ancora, l'acido fumarico e l'acido maleico (Kootstra *et al.*, 2009). Se invece si volessero provare metodi nuovi, i pretrattamenti alcalini, come l'impiego di perossido di idrogeno, potrebbero essere molto efficaci (Diaz *et al.*, 2013).

#### **4.4.1 Gli inibitori prodotti durante la fase di pretrattamento**

La resa di etanolo del microbo fermentante diminuisce a causa della presenza di composti inibenti quali acidi deboli, derivati del furano e composti fenolici generati durante la destrutturazione delle biomasse lignocellulosiche (Palmqvist *et al.*, 2000). Questi composti inibiscono le cellule di lievito e riducono il loro tasso di crescita, il tasso di produzione dell'etanolo e la resa di etanolo. Inoltre, la produzione di questi inibitori comporta la perdita di zuccheri fermentescibili (Palmqvist *et al.*, 2000; Klinke *et al.*, 2004).

<b>Substrati lignocellulosici</b>	<b>HMF</b>	<b>Furfurale</b>	<b>Acido acetico</b>	<b>Acido formico</b>
Lolla di riso H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0%	NR	NR	NR	0,04 ± 0,00
Lolla di riso H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%	NR	NR	NR	0,05 ± 0,00
Lolla di riso H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10%	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	NR	0,31 ± 0,12
Tralci di vite H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0%	NR	NR	NR	0,17 ± 0,07
Tralci di vite H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%	NR	NR	NR	0,10 ± 0,00
Tralci di vite H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10%	0,01 ± 0,00	NR	NR	0,50 ± 0,03

**Tabella 4.10** Quantità espressa in g/L degli inibitori prodotti durante il pretrattamento con acido solforico della lolla di riso e dei tralci di vite. I dati derivano dalla media di tre replicati indicando anche la deviazione standard. NR: non rilevato.

Come riportato in Tabella 4.10, l'inibitore maggiormente presente per entrambi i substrati è l'acido formico, la cui concentrazione più alta si rileva nel pretrattamento con acido solforico al 10%. L'acido formico si forma a partire dal furfurale e HMF in condizioni acide e ad alte temperature (Larsson *et al.*, 1999a; Palmqvist *et al.*, 2000), motivo per cui è ipotizzabile che l'assenza di questi sia dovuto alla loro conversione in acido formico. Ridotte concentrazioni di HMF e furfurale sono state riscontrate dopo il pretrattamento di lolla di riso e tralci di vite con acido solforico al 10%.

Altri studi condotti sulle potature di vite dimostrano che al termine di un pretrattamento tramite *steam explosion* non sono stati rilevati né HMF né furfurale (Buratti *et al.*, 2015). L'acido acetico, invece, viene rilasciato a causa della solubilità dei gruppi acetili contenuti nella struttura delle emicellulose (Buratti *et al.*, 2015), questo dimostra la scarsa efficienza del pretrattamento impiegato. Degli esperimenti condotti sulla lolla di riso hanno dimostrato come le condizioni blande di pretrattamento risultano inefficaci per l'idrolisi della struttura cristallina della cellulosa (Dagnino *et al.*, 2013). Le emicellulose, a causa del loro carattere amorfo, sono la parte della lolla di riso più facilmente idrolizzata, ragion per cui nel

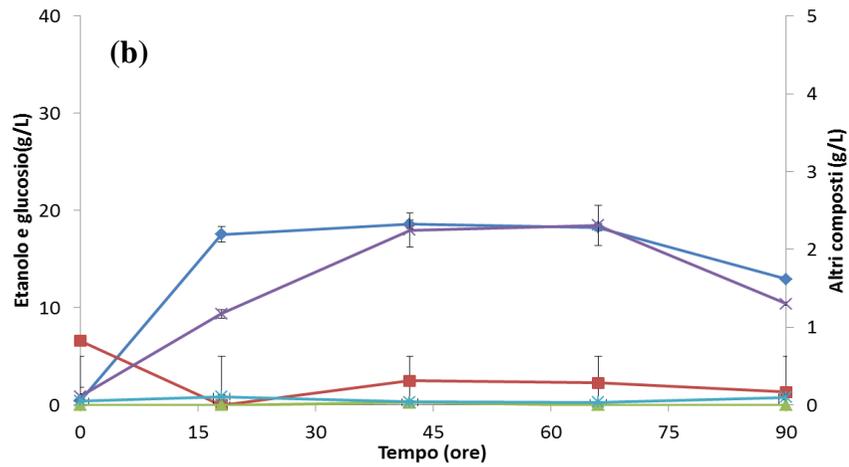
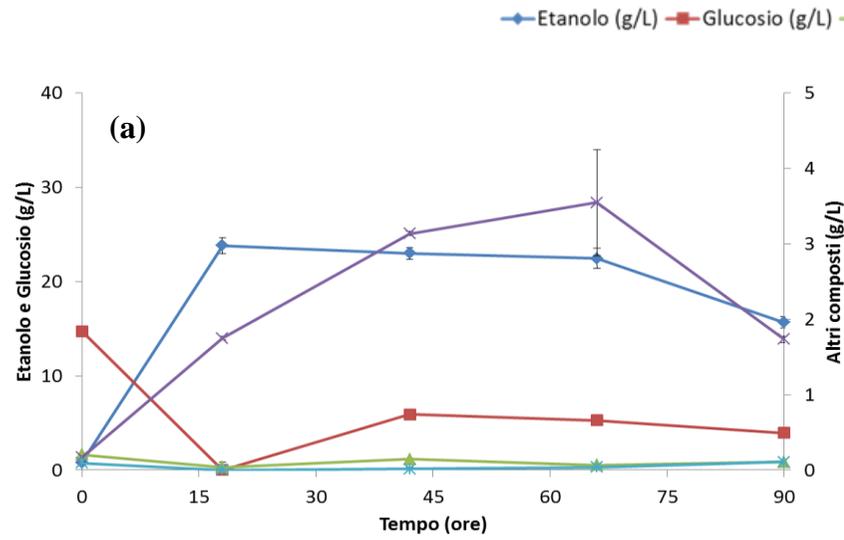
pretrattamento con acido solforico al 10% si genera una maggior concentrazione di acido formico ma anche HMF e furfurale (Tabella 4.10).

Come illustrato in Figura 4.2, grafici B e C, la lolla di riso pretrattata con acido solforico al 10% genera una minore quantità in xilosio e una concentrazione di glucosio non tanto differente da quella ottenuta nella lolla di riso pretrattata con acido solforico all'1%. L'incremento della concentrazione di acido solforico potrebbe, quindi, portare ad un aumento della formazione di inibitori prodotti dalla degradazione di glucosio e xilosio.

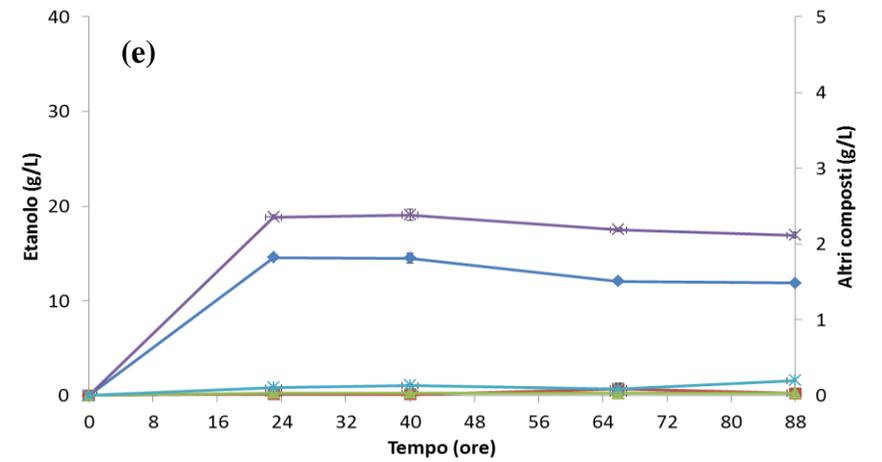
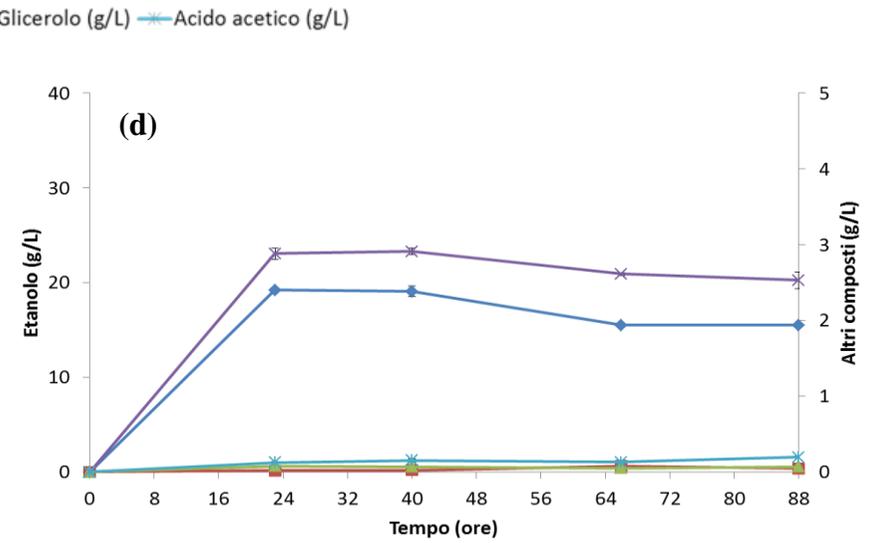
#### **4.5 Fermentazione di substrati zuccherini**

Allo scopo di valutare il potenziale di etanolo dei substrati zuccherini, quali frutti di *Prunus pissardi* Nigra, scarto di passatrice di pesche nettarine e scarto di prugne, sono state condotte cinetiche di fermentazione utilizzando il ceppo di lievito industriale *S. cerevisiae* MEL2, recentemente descritto per le sue elevate e promettenti *performances* fermentative (Favaro *et al.*, 2013b). In parallelo alle fermentazioni dei substrati (Figura 4.5a,b,c) sono state condotte anche fermentazioni di controllo utilizzando un terreno colturale contenente una composizione in zuccheri semplici simile a quella registrata nei substrati freschi (Figura 4.5d,e,f).

## Fermentazione di scarti zuccherini



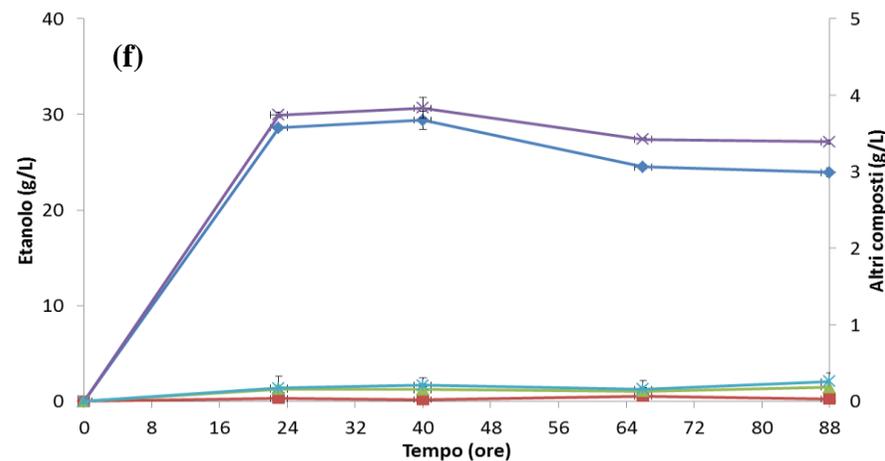
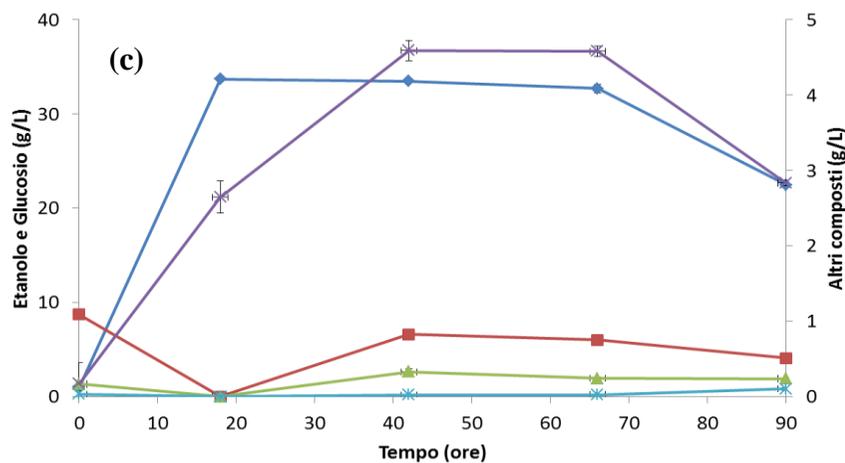
## Fermentazione di controllo



—◆— Etanolo (g/L) —■— Glucosio (g/L) —▲— Maltosio (g/L) —×— Glicerolo (g/L) —\*— Acido acetico (g/L)

### Fermentazione di scarti zuccherini

### Fermentazione di controllo



**Figura 4.5** Cinetiche di fermentazione da parte del ceppo *S. cerevisiae* MEL2 in bottigliette di fermentazione contenenti substrati zuccherini liofilizzati o essiccati e macinati per la fermentazione di scarti zuccherini, contenenti invece il “Mezzo Fermentazione di Controllo” la cui composizione degli zuccheri saccarosio, glucosio e fruttosio cambia a seconda dei substrati fermentati nel caso di fermentazioni di controllo: frutti di *Prunus pissardi* Nigra (a, d), scarto di passatrice di pesche nettarine (b, e) e scarto di prugne (c, f). I dati riportati rappresentano i valori medi di tre repliche incluse le deviazioni standard.

In accordo a quanto emerso dagli studi condotti da Favaro *et al.* (2013b), il lievito ha dimostrato un significativo vigore fermentativo utilizzando rapidamente tutti gli zuccheri fermentescibili. Infatti, in tutte le prove di fermentazione eseguite, la produzione di etanolo aumenta progressivamente fino a 72 ore.

Tra i vari sottoprodotti della fermentazione alcolica, il glicerolo è quello principalmente prodotto (Bai et al., 2008).

Nelle cinetiche sopra riportate (Figura 4.5a,b,c), si osserva che il contenuto di glicerolo incrementa quando aumenta la concentrazione di etanolo prodotto, mentre la produzione di acido acetico risulta simile nei tre substrati (circa 0,10 g/L). La quantità in glicerolo e acido acetico prodotti nella fermentazione di controllo è maggiore rispetto a quella registrata nella fermentazione dei substrati zuccherini nonostante venga prodotto meno etanolo.

Nel presente studio, la fermentazione dello scarto di prugne ha prodotto la concentrazione di etanolo più alta (33,69 g/L), mentre lo scarto di passatrice di pesche nettarine ne ha prodotto il quantitativo più basso (17,54 g/L).

Questi risultati confermano le aspettative visto il contenuto di zuccheri fermentescibili stimati con le analisi di estrazione di zuccheri solubili: frutti di *Prunus pissardi* Nigra (43,07 g/L), scarto di passatrice di pesche nettarine (32,60 g/L) e scarto di prugne (65,43 g/L).

Tuttavia, la quantità in etanolo prodotta a fine fermentazione in tutti i substrati zuccherini non corrisponde alla produzione di etanolo ottenuta nelle fermentazioni di controllo, in cui sono state aggiunte le quantità di zuccheri fermentescibili precedentemente indicate. Difatti, la differenza di etanolo rilevata è di circa 4,30 g/L.

È stato inoltre possibile confrontare le fermentazioni eseguite direttamente sui substrati con quelle di controllo tramite l'ausilio di alcuni parametri fermentativi quali: produttività volumetrica in etanolo (PV), massima produttività volumetrica in etanolo (MPV) e Resa (g etanolo/g zuccheri fermentescibili) (Tabella 4.11).

<b>Substrati di fermentazione</b>	<b>Etanolo (g/L)</b>	<b>PV<sup>a</sup> (g/L/h)</b>	<b>MPV<sup>b</sup> (g/L/h)</b>	<b>Resa (g /g zuccheri fermentescibili <sup>c</sup>)</b>
Frutti di <i>Prunus pissardi</i> Nigra	23,80	1,32	1,32	0,46 (90%)
MFC <sup>d</sup> di frutti di <i>Prunus pissardi</i> Nigra	19,20	0,83	0,83	0,45 (87%)
Scarto di passatrice di pesche nettarine	18,57	0,44	0,97	0,46 (90%)
MFC <sup>d</sup> di scarto di passatrice di pesche nettarine	14,56	0,63	0,63	0,45 (88%)
Scarto di prugne	33,69	1,87	1,87	0,46 (89%)
MFC <sup>d</sup> di scarto di prugne	29,40	0,73	1,24	0,45 (88%)

<sup>a</sup>PV: produttività volumetrica in etanolo (g/L/h); <sup>b</sup>MPV: massima produttività volumetrica in etanolo: (g/L/h) è stata determinata dopo 20 ore di incubazione; <sup>c</sup>zuccheri fermentescibili: saccarosio, glucosio e fruttosio; <sup>d</sup>MFC: Mezzo Fermentazione di Controllo

**Tabella 4.11** Parametri di fermentazione del ceppo *S. cerevisiae* MEL2 dopo 90 ore di incubazione in bottigliette di fermentazione su agitatore magnetico multistirrer. La resa è espressa come grammo di etanolo per grammo di zuccheri fermentescibili consumati e, tra parentesi, è indicata la percentuale rispetto alla massima resa teorica da zuccheri fermentescibili (0,51 g etanolo/g zuccheri fermentescibili). I dati dei coefficienti derivano dalla concentrazione più alta di etanolo prodotto dopo 90 ore ed è indicato nella prima colonna.

Le fermentazioni dei substrati zuccherini presentano un valore di MPV (Massima Produttività Volumetrica in etanolo) decisamente più elevato rispetto a quello delle fermentate di controllo. Inoltre, il massimo valore di MPV dei substrati zuccherini è stato registrato dopo 18 ore di incubazione mentre le fermentazioni di controllo raggiungono i valori più alti della

massima produttività volumetrica dopo 23 ore di fermentazione. Concordando con quanto suddetto, lo scarto di prugne presenta i massimi valori di PV (Produttività Volumetrica in etanolo) e di MPV. Tutti i substrati hanno riportato valori simili in termini di resa di etanolo.

## 5 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Di fronte alla crescente preoccupazione riguardo all'esaurimento delle riserve petrolifere e all'inquinamento ambientale, i biocarburanti di seconda generazione prodotti a partire da fonti rinnovabili non convenzionali di origine organica e non fossile rappresentano un'ottima prospettiva per il futuro.

In particolare, la produzione di bioetanolo come biocarburante di seconda generazione si basa principalmente su materiali lignocellulosici perché sono disponibili in quantità maggiori, non sono destinati al consumo alimentare, sono a basso costo e contribuiscono alla sostenibilità ambientale (Demirbas, 2003). Tuttavia, al momento la sua produzione non è attuabile perché non risulta conveniente economicamente a causa delle numerose barriere tecniche da superare prima di riuscire a sfruttare il potenziale delle biomasse residuali.

Il passaggio più costoso del processo produttivo è il pretrattamento per via della forte recalcitranza delle biomasse lignocellulosiche. Inoltre considerata la versatilità delle materie prime, sarebbe necessario progettare un sistema che abbia una combinazione generale di pretrattamento efficace nel convertire qualsiasi tipo di materia lignocellulosica in etanolo, prodotto di base del processo. È anche necessario che le tecnologie sviluppate per la produzione di biocarburanti siano ecosostenibili.

Prendendo come sistema modello la provincia di Verona, il Progetto BioRivaluta ha posto le basi per condurre una capillare indagine conoscitiva della disponibilità di scarti e sottoprodotti agroalimentari a basso costo con l'obiettivo di scoprirne il potenziale di conversione in etanolo.

Il presente lavoro di tesi ha consentito quindi di identificare le biomasse residuali più interessanti sulla base della loro composizione chimica qualitativa e quantitativa in termini di polisaccaridi e zuccheri semplici. Per quanto riguarda i residui lignocellulosici, i substrati selezionati sono la sansa di olive, la sansa di olive denocciolata, le piante di pomodoro sotto serra, la lolla di riso, la potatura di olivo, la potatura verde di Cabernet-Sauvignon e i tralci di vite. Per quanto concerne i residui alcoligeni, frutti di *Prunus pissardi* Nigra, scarto di passatrice di pesche nettarine e scarto di prugne si sono rivelati come i substrati più interessanti.

È stato possibile inoltre iniziare la messa a punto di processi di pretrattamento e idrolisi enzimatica delle matrici lignocellulosiche considerate più promettenti. I risultati preliminari finora ottenuti hanno evidenziato una potenzialità interessante ma anche la necessità di proseguire gli studi per la definizione di alcuni parametri chiave quali la tipologia di pretrattamento che risulta impattante per fasi successive del processo, il dosaggio enzimatico dei cocktail enzimatici commerciali, la temperatura, il pH del mezzo e la concentrazione di substrato.

Per quanto concerne i substrati prevalentemente zuccherini, le fermentazioni condotte con un ceppo di lievito industriale *S. cerevisiae* MEL2 hanno mostrato risultati molto interessanti.

In conclusione, questo lavoro di tesi ha contribuito ad avviare una sperimentazione scientifica finalizzata alla conversione di scarti e sottoprodotti agroalimentari in bioetanolo di seconda generazione. Una simile prospettiva sarà realizzabile tramite ulteriori sforzi di ricerca scientifica e con la formazione di sinergie con altri enti quali la Pubblica Amministrazione e gli Enti di ricerca nazionali.

Tali sinergie promuoveranno la nascita di accordi e consorzi di filiera utili per la successiva industrializzazione del processo. Inoltre si potranno creare le basi per la costruzione di un impianto pilota e, in seguito, di un impianto su larga scala in funzione della disponibilità di residui e scarti agro-alimentari forniti dall'area veneta valutandone la tipologia, la collocazione, la stagionalità e la rilevanza a livello quantitativo delle biomasse.

## 6 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Albergo R., Ambrico A., Balducchi R., Maccioni O., Palazzo S., Trupo M., (2013), Produzione di bioetanolo da biomasse provenienti da siti di fitodepurazione nell'ambito del progetto fitoprobio, *ENEA*, 1-82.

Almeida J., Modig T., Petersson A., Hähn-Hägerdal B., Liden G., Gorwa-Grauslund M., (2007), Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **4**: 340–349.

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

AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), (2010), Official methods of analysis, 18th ed. AOAC, Arlington, VA.

Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young M., (2008), Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks, *Biotechnology Advances*, **26**: 89–105.

Börjesson J., Engqvist M., Sipos B., Tjerneld F., (2007), Effect of poly (ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose, *Enzyme and Microbial Technology*, **41**: 186–195.

Buratti C., Barbanera M., and Lascaro E., (2015), Ethanol Production from Vineyard Pruning Residues with Steam Explosion Pretreatment, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, **34**: 802-809.

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 Lignocellulosics?, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **108**: 67-93.

Chang V.S., Holtzapple M., (2000), Fundamentals factors affecting biomass reactivity, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **84–86**: 5–37.

Chen F., Srinivasa R.M.S., Temple S., Jackson L., Shadle G., Dixon RA., (2006), Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of

syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.), *The Plant Journal*, **48**: 113-24.

Choi C.H., Mathews A.P., (1996), Two-step acid hydrolysis process kinetics in the saccharification of low-grade biomass: 1, Experimental studies on the formation and degradation of sugar, *Bioresource Technology*, **58**: 101-106.

Clark T.A. and Mackie K.L., (1984), Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **24/25**: 1-14.

Cripwell R., Favaro L., Shaunita H.R., Basaglia M., Cagnin L., Casella S., van Zyl W., (2015), Utilisation of wheat bran as a substrate for bioethanol production using recombinant cellulases and amylolytic yeast, *Applied Energy*, 10.1016/j.apenergy.2015.09.062.

Dagnino E.P., Chamorro E.R., Romano S.D., Felissia F.E., M.C. Area M.C., (2013), Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production, *Industrial Crops and Products*, **42**: 363– 368.

Decreto Legislativo n. 387, (2003), Attuazione della direttiva 2001/77/CE relativa alla promozione dell'energia elettrica prodotta da fonti energetiche rinnovabili nel mercato interno dell'elettricità, Gazzetta Ufficiale n. 25 del 31 gennaio 2004 - Supplemento Ordinario n. 17.

Demirbas A., (2003), Energy and environmental issues relating to greenhouse gas emissions in Turkey, *Energy Convers Manage*, **44**: 201-13.

Diaz A., Le Toullec J., Blandino A., De Ory I., Caro I., (2013), Pretreatment of Rice Hulls with Alkaline Peroxide to Enhance Enzyme Hydrolysis for Ethanol Production, *Chemical Engineering Transactions*, **32**: 949-954.

Direttiva 2009/28/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, (2009), “promozione dell’uso dell’energia da fonti rinnovabili”, modifica e successiva abrogazione delle direttive 2001/77/CE e 2003/30/CE, Gazzetta ufficiale dell’Unione Europea, 5.6.2009, L 140/16.

Dunlop A.P., (1948), Furfural formation and behaviour, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **40**: 204-209.

Eisberg N., (2006), Harvesting energy, *Chemistry and Industry*; **17**: 24–5.

EU Biofuels Annual 2013, NL3034 ,13 agosto 2013.

Favaro L., Basaglia M., Casella S., (2012a), Processing wheat bran into ethanol using mild treatments and highly fermentative yeasts, *Biomass and bioenergy*, **46**: 605-617.

Favaro L., Jooste T., Basaglia M., Saunita H.R., Saayman M., Gorgens J.F., Casella S., van Zyl W.H., (2012b), Codon-optimized glucoamylase sGAI of *Aspergillus awamori* improves starch utilization in an industrial yeast, *Applied genetics and molecular biotechnology*, **95**: 957-968.

Favaro L., Basaglia M., Trento A., Van Rensburg E., Garcìa-Aparicio M., van Zyl W.H., Casella S., (2013a), Exploring grape marc s troye for new thermotolerant and inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation bioethanol production, *Biotechnology for biofuels*, **6**: 168.

Favaro L., Basaglia M., van Zyl W.H., Casella S., (2013b), Using an efficient fermenting yeast enhances ethanol production from unfiltered wheat bran hydrolysates, *Applied Energy*, **102**: 170–178.

Favaro L., Jooste T., Basaglia M., Rose S.H., Saayman M., Gorgens J.F., Casella S., van Zyl W.H., (2013c), Designing industrial yeast for the consolidated bioprocessing of starchy biomass to ethanol, *Bioengineered*, **4**: 1-6.

Galbe M., Zacchi G., (2007), Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production, *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, **108**: 41–65.

Gelleti R., Jodice R., Mauro G., Migliardi D., Picco D., Pin M., Tomasinsig E., Tommasoni L., Chinese D., Monaco B., Nardin G., Simeoni P., (2006), Energia dalle biomasse, *AREA science park*, **24**: 1-261.

International Energy Agency (IEA), (2008), From 1st- to second-generation Biofuel Technologies: An Overview of Current Industry and RD&D activities, OECD/IEA, Paris.

International Energy Agency (IEA), (2010), Sustainable Production of second-generation biofuels potential and perspectives in major economies and developing countries, OECD/IEA, Paris.

Ioelovich M., (2013), Plant Biomass as a Renewable Source of Biofuels and Biochemicals, *Lambert Academic Publishing*, 1-58.

Jäger G., Büchs J., (2012), Biocatalytic conversion of lignocellulose to platform chemicals, *Biotechnology Journal*, **7**: 1122–1136.

John P.R., Anisha G.S., Nampoothiri K.M., Pandey A., (2011), Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol, *Bioresource Technology*, **102**: 186–193.

Klinke H.B., Olsson L., Thomsen A.B., Ahring B.K., (2003), Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast, *Biotechnology and Bioengineering*; **4**: 738–747.

Klinke H.B., Thomsen A.B., Ahring B.K., (2004), Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **66**: 10–26.

Kootstra A.M.J., Beeftink H.H., Scott E.L., Sanders J.P.M., (2009), Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw, *Biochemical Engineering Journal*, **46**: 126–131.

Ladisich M.R., Mosier N.S., Kim Y., Ximenes E., Hogsett D., (2010), Converting cellulose to biofuels, *Small Business Economics special supplement biofuels CEP*, **106**: 56-63.

Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hagerdal B., Tenborg C., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N.O., (1999a), The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood, *Enzyme and Microbial Technology*, **24**: 151–159.

Larsson S., Reimann A., Nilvebrant N.O., Jonsson L.J., (1999b), Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce, *Applied Biochemistry and Biotechnology*; **4**: 91–103.

Laursen, W., (2006), Students take a green initiative, *Chemical Engineering*, 32-34.

Limayem A., Ricke S.C., (2012), Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects; *Progress in Energy and Combustion Science*; **38**: 449-467.

Lynd L.R., (1996), Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and the policy, *Annual Review of Energy and the Environment*, **21**: 402-465.

Mamma D., Koullas D., Fountoukidis G., Kekos D., Macris B.J., Koukios E., (1996), Bioethanol from sweet sorghum: simultaneous saccharification and fermentation to carbohydrates by a mixed microbial culture, *Process Biochemistry*, **31**: 377-381.

Martin C. and Jonsson L., (2003), Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors, *Enzyme and Microbial Technology*, **32**: 386-395.

Miller G.L., (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical chemistry*, **31**: 426-428.

Mosier N., Hendrickson R., Ho N., Sedlaka M., Ladisch M.R., (2005a), Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover, *Bioresource Technology*, **96**: 1986–1993.

Mosier N., Wyman C.E., Dale B.D., Elander R.T., Lee Y.Y., Holtzapfle M., Ladisch C.M., (2005b), Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource. Technology*, **96**: 673-686.

Mussatto S.I., Dragone G., Guimarães P.M.R., Silva J.P.A, Carneiro L.M., Roberto I.C., Vicente A., Domingues L., Teixeira J.A., (2010), Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production, Research review paper , *Biotechnology Advances*, **28**: 817–830.

Mussatto S.I., Fernandes M., Milagres A.M.F., Roberto I.C., (2008), Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain, *Enzyme and Microbial Technology*, **43**: 124–129.

Nilvebrant N.O., Persson P., Reimann A., De Sousa F., Gorton L. and Jönsson L.J., (2003), Limits for alkaline detoxification of dilute acid lignocellulose hydrolysates, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **105-108**: 615-628.

Ohgren K., Bengtsson O., Gorwa-Grauslund M.F., Galbe M., Hahn-Hagerdal B., Zacchi G., (2006), Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of biotechnology*, **126**: 488-498.

Palmqvist E., Hahn-Hagerdal B., (2000), Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition, *Bioresource Technology*, **74**: 25-33.

Perez J., Munoz-Dorado J., de la Rubia T. and Martinez J., (2002), Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview, *International Microbiology*, **5**: 53-63.

Pietrobelli C., Pugliese E., (2007), L'economia del Brasile. Dal caffè al bioetanolo: modernità e contraddizioni di un gigante, Carocci editore.

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

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, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **161**: 468-482.

Sun Y., Cheng J., (2002), Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource Thecnology*, **83**: 1-11.

Sweeney M.D., Xu F., (2012), Biomass converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: recent developments, *Catalysts Review*, **2**: 244-263.

Thygesen A., Vahlgren L., Frederiksen J.H., Linnane W., Thomsen M.H. (2012), SSF Fermentation of rape straw and the effects of inhibitory stress on yeast, *Bioethanol*, **10**: 209-222.

Tran A.V. and Chambers R.P., (1986), Lignin and extractives denved mhlbltors in the 2,3-butanediol fermentation of mannose-rich prehydrolysates, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **23**: 191-197.

Ulbricht R.J., Northup S.J., Thomas J.A., (1984), A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions, *Fundamental and Applied Toxicology*, **4**: 843-853.

Usenik V., Fabcic J., Stampar F., (2008), Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity, of sweet cherry (*Prunus avium* L.), *Food Chemistry*, **107**: 185–192.

van Zyl W.H., Lynd L.R., den Haan R., McBride J.E., (2007), Consolidated BioProcessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **108**: 205–235.

Verardi A., De Bari I., Ricca E., Calabrò V., (2012), Hydrolysis of lignocellulosic biomass: current status of processes and technologies and future perspectives, *Bioethanol*, **5**: 95- 117.

Viktor M.J., Rose S.H., van Zyl W.H., Viljoen-Bloom M., (2013), Raw starch conversion by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Aspergillus tubingensis* amylase, *Biotechnology for Biofuels*, **6**: 167.

Yang B., Wyman C.E., (2004), Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover with water, *Biotechnology and Bioengineering*; **86**: 88-95.

Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L., (2001), Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**: 17-34.

Zhang Y.H., Lynd L.R., (2004), Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non complexed cellulase systems, *Biotechnology and Bioengineering*, **88**: 797–824.