



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e
Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie viticole ed enologiche

Valutazione preliminare allo scale-up di un impianto
per l'estrazione di proteine da sottoprodotti ottenuti
mediante distillazione

Docente di riferimento

Prof. Lorenzo Guerrini

Docente correlatore

Dott. Alberto De Iseppi

Laureando

Alessandro Benincà

Matricola n. 2006056

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Storia origine del vino	1
1.2 La vinificazione	2
1.2.1 La vinificazione in bianco	2
1.2.2 La vinificazione in rosso	3
1.3 Formazione dei sottoprodotti	4
1.4 Le borlande.....	7
1.4.1 Valorizzazione energetica della borlanda.....	9
1.4.2 Valorizzazione della borlanda in campo enologico.....	10
1.4.4 Le proteine contenute nelle borlande	11
1.5 I metodi d'estrazione	12
1.5.1 Metodo d'estrazione delle proteine	12
1.6 Formazione delle fecce	13
1.6.1 Valorizzazione delle fecce.....	14
2. SCOPO DELLA TESI	16
3. MATERIALI E METODI	17
3.1 Preparazione dei campioni	17
3.2 Determinazione delle proprietà fisiche	20
3.2.1 Viscosità e Densità	20
3.2.2 Calore specifico	23
3.3 Prima fase di determinazione delle proteine	24
3.3.1 Determinazione delle proteine.....	26
3.4 Analisi Statistica	30
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	31
4.1 Proteine	31
4.2 Viscosità	35
4.3 Densità	39
4.4 Calore specifico	40
4.5 Considerazioni preliminari allo scale-up di un impianto	41
5. CONCLUSIONI	48
Sitografia e Bibliografia	50

1. INTRODUZIONE

1.1 Storia origine del vino

Il vino ha origini antichissime: grazie ad una scoperta avvenuta in maniera casuale si ritiene che i primi degustatori di tale bevanda fossero già presenti nel neolitico. L'uva era conservata all'interno dei contenitori che facevano partire delle fermentazioni naturali e spontanee ad opera di lieviti indigeni. Tuttavia, le prime testimonianze dirette della produzione di vino sono associate a 9000-10000 anni fa nella zona del Caucaso; per assistere invece ad un aumento importante di produzione bisogna aspettare tra il 4100-4000 a.C. Successivamente, durante il periodo delle civiltà greche e romane, si assiste ad una richiesta su grande scala di vino che diventa una bevanda di uso quotidiano. Ad ogni modo, la bevanda che veniva ottenuta in quel tempo non può essere paragonabile in nessun modo con il termine vino che adesso utilizziamo per identificarlo a causa delle limitate conoscenze di metodologie di produzione e conservazione. Infatti il vino risultava essere una sostanza sciropposa, molto dolce e alcolica ed era quindi necessario allungarlo con acqua aggiungendo miele e spezie per ottenere un sapore più gradevole. Dopo la caduta dell'Impero Romano, si assiste nei decenni successivi ad un minor interessamento per la cultura del vino, questo avvenne per una serie di molteplici ragioni come le invasioni da parte di popolazioni con una cultura differente da quella europea. Per tutto il medioevo la cultura del vino non ha avuto grandi sviluppi, esso veniva prodotto principalmente all'interno dei monasteri grazie ai monaci benedettini, fatta eccezione la Francia che ha continuato a produrlo ed a esportarlo anche nel nuovo continente. La vera rinascita della cultura del vino in Italia si assiste intorno al 1850 una volta superata la crisi dovuta alla Fillossera della vite, insetto che ha messo in crisi la viticoltura in tutto il mondo. Dal '900 si è potuto così assistere ad un miglioramento generale di tutta la filiera enologica, partendo dalla produzione in campo fino al

raggiungimento del prodotto finale, puntando soprattutto negli ultimi anni più sulla qualità che alla quantità.

1.2 La vinificazione

La vinificazione è il concetto generale che porta alla formazione del vino, attraverso processi biochimici di trasformazione, partendo dalla materia prima l'uva. Ad oggi le tecniche di produzione sono molteplici, esse variano in base all'obiettivo enologico che si vuole raggiungere. Secondo la letteratura le vinificazioni classiche più conosciute a livello globale sono due: quella in bianco e quella in rosso. Oltre a queste due ne esistono altre e servono per ottenere alcune tipologie di vino con caratteristiche diverse, tra queste ricordiamo la macerazione carbonica, la termovinificazione, la vinificazione in riduzione o in iperossidazione e la vinificazione in rosé.

All'interno di ogni vinificazione si possono percorrere strade diverse per ottenere il prodotto finale desiderato. Ad esempio, si può utilizzare una vinificazione in bianco per ottenere dei vini bianchi partendo da uva a bacca rossa o anche ottenere dei vini bianchi attraverso la vinificazione in rosso di uva a bacca bianca. In ogni caso in tutte le diverse tipologie di vinificazione sono presenti delle fasi che vengono sempre ripetute come la fermentazione, il tempo di affinamento, l'imbottigliamento e le eventuali correzioni.

1.2.1 La vinificazione in bianco

Per la vinificazione in bianco, l'uva, una volta arrivata in cantina, subisce i processi di diraspa-pigiatura e pressatura ottenendo così il mosto. Il primo succo che deriva dalla pigiatura prende il nome di mosto fiore; esso costituisce la parte più nobile dovuta alla presenza di una maggiore quantità di acidi e zuccheri e ad una minore concentrazione in estratti e tannini. Il restante succo, presente ancora all'interno degli acini, viene estratto attraverso diverse intensità di pressatura. A

parità di tempo, la prima pressatura ne estrae una maggiore quantità rispetto a quelle effettuate nei cicli successivi con una pressione maggiore. Infatti, per poter ottenere una stessa quantità di prodotto estratto, nelle pressature con una maggiore intensità, bisogna aumentare il tempo di pressatura. Questo va a discapito della qualità del succo per l'aumento di polifenoli estratti.

Successivamente il mosto subisce la prima trasformazione biochimica attraverso la fermentazione alcolica. I lieviti attivi una volta preparati vengono aggiunti all'interno dei vasi vinari e fanno iniziare la fermentazione. La durata di questa fase varia tra i 5 e i 12 giorni ad una temperatura di $15^{\circ}\text{C}/17^{\circ}\text{C}$, inferiore rispetto a una vinificazione in rosso. A ridosso della fine della fermentazione viene effettuato il primo travaso e nelle settimane successive ad esso ne verranno eseguiti altri il cui numero può variare a seconda dell'obiettivo di limpidezza che si vuole raggiungere. Il vino, prima di essere imbottigliato, può subire un processo di affinamento o, in alternativa, venir utilizzato per ottenere dei vini spumanti attraverso il processo di spumantizzazione. Per fare ciò viene effettuata una seconda fermentazione alcolica, in bottiglia o in autoclave, a seconda del metodo se classico o Charmat-Martinotti. Importanti sono le eventuali correzioni che devono essere effettuate al mosto/vino attraverso l'utilizzo di chiarifiche, filtrazioni, stabilizzazioni o ad eventuali aumenti di acidità o di titolo alcolometrico.

1.2.2 La vinificazione in rosso

Per quanto riguarda la vinificazione in rosso, le principali differenziazioni presenti rispetto alla vinificazione in bianco sono: la macerazione in contemporanea con la fermentazione alcolica, la presenza della svinatura e il periodo in cui viene eseguita la pressatura. Infatti, dopo la diraspa-pigiatura non viene eseguita la pressatura e i quantitativi di mosto-vinacce vengono portati all'interno dei vasi vinari. Qui inizia il processo di macerazione che consiste nel lasciare per un periodo di tempo il mosto a contatto con le vinacce per favorire l'estrazione di

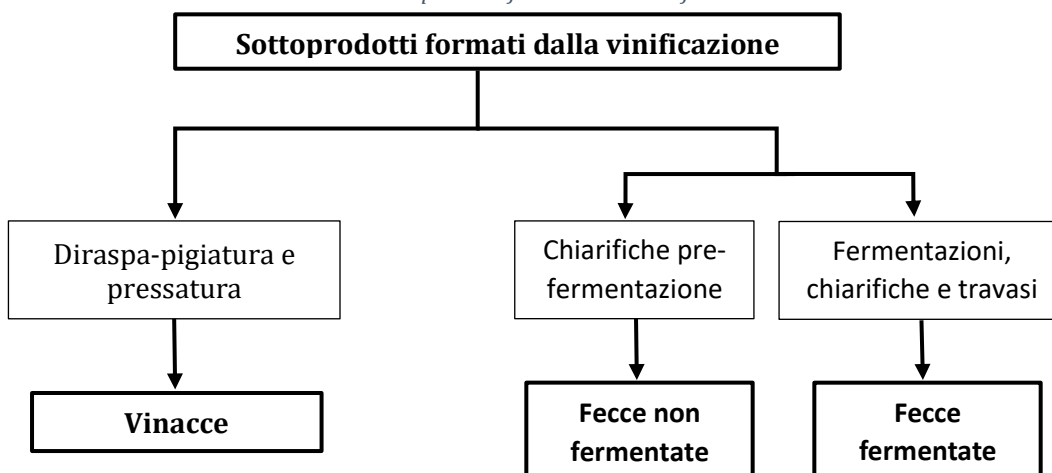
tannini e di antociani dalle bucce. Sono presenti tre diverse macerazioni che variano in base a quando viene effettuata: la macerazione pre-fermentativa, quella fermentativa e la post-fermentativa. Principalmente nella vinificazione in rosso viene effettuata la macerazione fermentativa utilizzando una temperatura che varia da 20-25 fino a 35 °C e con una durata che si aggira attorno a 8-10 giorni, ossia il tempo medio necessario al lievito per poter svolgere completamente la fermentazione. Le altre due macerazioni vengono eseguite per particolari situazioni, ad esempio quella pre-fermentativa viene fatta a basse temperature per evitare ossidazioni, l'innesco di fermentazioni spontanee non controllate e per incrementare l'estrazione di sostanze solubili dalle parti solide dal mosto. Invece la macerazione post-fermentativa ha l'obiettivo di stabilizzazione del vino stesso con l'ottenimento di vini rossi meno colorati ma molto stabili con caratteristiche organolettiche pregevoli. Una volta terminata la macerazione viene effettuata la svinatura, processo che consiste nella separazione del vino dalle vinacce. Ad essa segue la pressatura in cui piccole quantità di succo estratto per pressione vengono aggiunte al mosto fiore. Le fasi successive alla svinatura e pressatura sono associabili alle fasi presenti nella vinificazione in bianco. Il vino prima dell'imbottigliamento trascorre un periodo di affinamento all'interno di botti di legno che varia in base alla tipologia di vino che si vuole ottenere. Qui subisce alcune trasformazioni, come la stabilizzazione del colore per formazione di complessi tannino-antociani e la limatura delle varie spigolosità che presenta dal punto di vista aromatico. Il periodo di affinamento per un vino di pronta beva può essere di soli 2-3 mesi mentre per vini più complessi può durare anche anni.

1.3 Formazione dei sottoprodotti

In tutte le fasi della vinificazione si formano in grande quantità dei sottoprodotti, a partire dalla pressatura fino ad arrivare alle ultime filtrazioni prima dell'imbottigliamento. L'obiettivo delle aziende, soprattutto quelle di dimensioni

maggiori, è cercare di riutilizzare il grande quantitativo di sottoprodotti formati, senza che essi vengano smaltiti come rifiuti. Questo consente un risparmio importante sulle spese legate allo smaltimento e permette di rendere più sostenibile il processo di produzione di un vino. I sottoprodotti che si formano dal processo di vinificazione sono: le vinacce durante la fase di diraspa-pigiatura e pressatura mentre le fecce durante la fase di fermentazione, chiarifica e travaso (schema 1).

Schema 1 – Schema sottoprodotti formati dalla vinificazione



Le vinacce sono il primo sottoprodotto che si ottiene dopo aver eseguito la diraspa-pigiatura e la pressatura. Mediamente pressando un quantitativo di 100 *kg* di uva, si ottengono 80 *kg* di mosto e 20 *kg* di vinacce (Infowine 2022). Esse sono costituite percentualmente da: 50% di bucce, 25% di vinaccioli e il restante 25% da raspi. Questo sottoprodotto può essere utilizzato in molteplici ambiti, ad esempio come materia prima per la formazione di distillati come la grappa. La vinaccia che deriva dalla vinificazione in bianco, che non ha effettuato la fermentazione alcolica, è definita vinaccia vergine. Essa per essere utilizzata durante il processo di distillazione deve subire la fermentazione alcolica. Discorso diverso per quanto riguarda le vinacce ottenute dalla vinificazione in rosso e in rosé, definite rispettivamente fermentate e semi-fermentate. Tali vinacce hanno inoltre subito un processo di macerazione. Per la produzione della grappa i residui dei raspi presenti vengono eliminati; infatti, effettuare questo passaggio è il

primo passo per ottenere un prodotto di qualità. Successivamente alle vinacce vergini vengono aggiunti dei lieviti selezionati attivi per far partire la fermentazione in situazione controllata. Esse risultano essere quelle più difficili da gestire per il loro basso contenuto di acidità fissa, per l'alto contenuto di zuccheri pronti a fermentare e per il fatto di essere soggette ad attacchi ad opera di batteri.

Una volta terminata la fermentazione, le vinacce vengono distillate attraverso un impianto di tipo continuo o di tipo discontinuo. La differenza tra i due consiste nel fatto che il primo permette al ciclo di avvenire automaticamente e senza interruzioni. Nel caso in cui venga effettuata una distillazione discontinua, esistono due tipi di alambicchi: a caldaiette a vapore e a bagnomaria. Le fasi presenti nella prima tipologia sono così descritte:

- riempimento di piccole caldaie disponendo la vinaccia in cestelli forati posti all'interno;
- riscaldamento della vinaccia con vapore acqueo;
- distillazione ed estrazione della grappa in un unico passaggio, eliminando testa e coda (distillato iniziale e finale) e conservando solo il cuore (la parte migliore);
- eliminazione della vinaccia esausta e lavaggio della caldaia.

La durata di questo ciclo oscilla tra un'ora e mezza e le tre ore.

Negli impianti a bagnomaria, invece, la vinaccia non viene riscaldata direttamente dal vapore, ma indirettamente per contatto. Per far avvenire lo scambio termico viene aggiunta l'acqua alle vinacce (Tesi Alessio Zanardo 2010-2011), a questo punto la caldaia può essere riscaldata. La durata di tale processo di distillazione è maggiore rispetto a quello precedente.

Dal punto di vista aromatico si ottengono con l'utilizzo del processo continuo delle grappe morbide, equilibrate con aromi varietali catturati in modo selettivo e preciso. Invece con il processo discontinuo si ottengono delle grappe

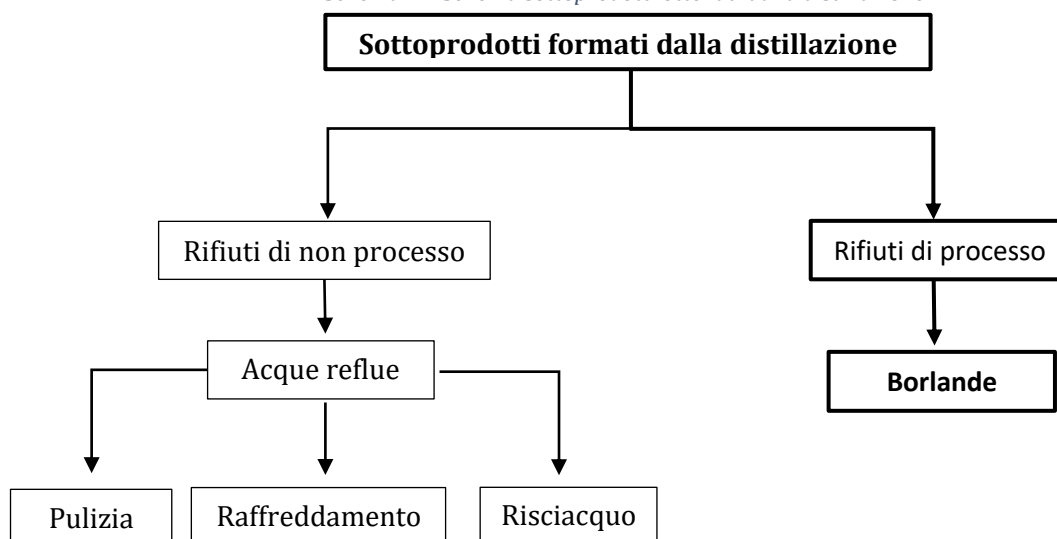
aromaticamente importanti e fortemente caratterizzate. Come per la vinificazione del vino anche la grappa ha un periodo di affinamento. Viene posta all'interno di cisterne inox per almeno 6 mesi a seconda dell'obiettivo che si intende raggiungere.

1.4 Le borlande

Al termine del processo di distillazione si forma una grande quantità di borlande che risulta essere anche 15 volte maggiore rispetto all'alcol prodotto.

L'industria della distilleria nel settore alimentare è una delle fonti principali di inquinamento atmosferico, specialmente per quanto riguarda il rilascio di sottoprodotti non trattati nell'ambiente che inquinano le acque e riducono l'alcalinità del suolo. Per arginare questo tipo di problema, soprattutto negli ultimi anni, si stanno cercando nuove soluzioni per la valorizzazione dei sottoprodotti impegnando aziende e ricercatori di tutto il mondo. Secondo la letteratura la possibilità più interessante per la valorizzazione dei sottoprodotti è il loro utilizzo come materia prima rinnovabile per il recupero di energia e materiali di origine biologica, consentendo così l'integrazione della bonifica e del recupero delle risorse. In ogni distilleria, destinata alla produzione di grappe o alla produzione di altre sostanze, si formano due tipi di rifiuti: rifiuti di processo e di non processo (schema 2).

Schema 2 – Schema sottoprodotti ottenuti dalla distillazione



Tra i rifiuti non di processo vengono comprese le acque reflue derivanti dalla pulizia, dal raffreddamento e dal risciacquo generato nelle diverse fasi della produzione di alcol. Rientrano invece nella categoria dei rifiuti di processo le borlande. Nelle nuove distillerie ne vengono prodotte dai 10 ai 12 L per ogni litro di alcol. La loro composizione è costituita da fibre, olio, proteine, polisaccaridi, cellule di lievito ed altre componenti non fermentate dall’uva o da altre materie prime utilizzate come prodotto da distillare (ad esempio il grano). Di solito la borlanda subisce una centrifugazione con formazione di una borlanda sottile (liquida) e di una frazione solida (fanghi di fermentazione). Dalla loro combinazione si possono ottenere dei mangimi per animali. Esclusivamente nei fanghi di fermentazione sono presenti lieviti che possono essere diluiti e riciclati per mantenere la concentrazione dell’unità di fermentazione. La borlanda sottile, invece, presenta ancora il 5-10% di solidi. Attraverso questo sottoprodotto, se ottenuto dalla distillazione del grano, una frazione significativa, nell’ordine del 15%, può essere utilizzato come acqua per la preparazione dell’impasto del grano macinato. Un’altra frazione, invece, viene utilizzato per la preparazione di uno sciroppo chiamato *condensed distillers’ solubles* (CDS) attraverso l’utilizzo di evaporatori a effetto multiplo.

In generale la borlanda è caratterizzata da un'elevata concentrazione di sostanza organica che alla vista presenta un colore marrone scuro. Il contenuto dato dalla presenza del fabbisogno chimico di ossigeno (COD), dal fabbisogno biochimico di ossigeno (BOD) e dal colore scuro risulta essere presente per l'intervento di composti organici, quali: polifenoli, melanoidine, cere, polisaccaridi, zuccheri ridotti, lignina, proteine, carotenoidi, clorofilla, antociani, tannini ecc., che sono difficili da biodegradare e inibiscono l'attività biologica.

Le melanoidine sono una classe di macromolecole colloidali, aventi un anello benzoico. Presentano un colore scuro e un odore tipico del pane appena sfornato o del caffè tostato. Queste macromolecole si formano durante la cottura dei cibi a partire dagli zuccheri, attraverso la reazione di Maillard o attraverso reazioni non enzimatiche di imbrunimento che portano i carboidrati ed aminoacidi ad una temperatura superiore ai 50°C e a valori di pH tra i 4 e i 7. Per quanto riguarda i polifenoli presenti, essi si dividono in tre categorie: acidi fenolici, flavonoidi e tannini. La borlanda, a causa della materia organica solubile, è considerata problematica e i rifiuti probabilmente contaminati. Il trattamento per la pulizia delle borlande è difficoltoso per l'enorme quantità di volume e per la presenza di alcuni composti resistenti. Recenti studi si sono focalizzati nel definire la composizione della borlanda e sui valori nutrizionali per la produzione di mangimi per animali.

1.4.1 Valorizzazione energetica della borlanda

Un altro sistema per il loro smaltimento consiste nell'adoperarle per il recupero di energia tramite biometanazione grazie all'alta concentrazione di materia organica ed alla presenza di composti organici disciolti. In media, da 1 m^3 di borlanda di distilleria vengono prodotti 38-40 m^3 di biogas. Inoltre, le borlande possono seguire il processo di formazione di bioetanolo che consiste nell'ottenere dell'etanolo di seconda generazione. Tuttavia, la presenza di composti indesiderati idrolizzati, come il 2-furfurale e il 5-idrossimetilfurfurale,

limita la biotrasformazione della borlanda in etanolo di seconda generazione. I furfurali, sottoprodotti della depolimerizzazione dei polisaccaridi, influiscono negativamente sullo sviluppo dei lieviti, inibendo o addirittura arrestando la fermentazione alcolica. Per aumentare maggiormente il potenziale di fermentazione si possono convertire le cellulose ed emicellulose in zuccheri fermentabili.

Sempre nel campo di recupero dell'energia pulita, la produzione di bioidrogeno sembra essere una delle soluzioni più accreditate per lo smaltimento delle borlande. L'idrogeno molecolare è considerato la fonte energetica più promettente grazie al suo alto contenuto energetico (143 kJ/g) e all'assenza di emissioni di CO_2 . La trasformazione della materia organica in bioidrogeno può essere sia autotrofa (biofotolisi) che eterotrofa (fermentazione al buio e foto-fermentazione). La foto-fermentazione è condotta da batteri viola non solforati, che utilizzano la luce come fonte di energia e composti organici come fonte di carbonio ed elettroni. La fermentazione al buio non richiede energia luminosa e può utilizzare un'ampia varietà di substrati per la produzione di idrogeno.

Infine, l'ultimo campo energetico in cui la borlanda può essere utilizzata è per la produzione di energia elettrica. Essa avviene tramite processi bioelettrochimici in cui l'energia chimica immagazzinata in materiali organici biodegradabili viene convertita in corrente elettrica sfruttando l'attività catalitica dei microrganismi. Nel processo di bioelettrogenesi, protoni ed elettroni possono essere raccolti come energia elettrica in presenza di un elettrodo in una cella a combustibile microbica (MFC). Gli MFC possono essere impiegati per la produzione di biocarburanti attraverso l'utilizzo di batteri elettrochimicamente attivi.

1.4.2 Valorizzazione della borlanda in campo enologico

Oltre al campo dell'energia, negli ultimi anni si stanno studiando altri metodi per la valorizzazione delle borlande, soprattutto per la presenza di polisaccaridi e proteine dovuti alla presenza di *Saccharomyces cerevisiae*. Essi rappresentano la

parete cellulare del lievito intorno ad un valore del 15-30% del peso secco, a seconda delle condizioni di crescita. La loro composizione è caratterizzata da proteine e strati di polisaccaridi diversi interconnessi tra loro. Lo strato esterno è costituito da mannoproteine, collegati ad una matrice di beta-1,3 glucano amorfo, mentre lo strato interno è costituito da beta-1,3 glucano fibroso; sopra è presente una piccola quantità di chitina.

1.4.4 Le proteine contenute nelle borlande

Per le proteine, invece, l'estrazione può essere sfruttata attraverso il recupero di mannoproteine. Esse sono il secondo componente della parte cellulare del lievito. Sono costituiti da polimeri di mannosio attaccati covalentemente a una struttura proteica (Cameron, Cooper e Neufeld, 1988). Visto la loro struttura anfipatica (presenta sia un gruppo idrofilo e un gruppo idrofobo) in cui i polimeri idrofili del mannosio sono legati alle proteine, sono stati sperimentati come emulsionanti in numerose applicazioni alimentari ed in enologia come stabilizzante proteico, tartarico e come esaltatore di schiuma in bocca. I primi articoli effettuati sulle mannoproteine hanno riferito la loro capacità nello stabilizzare le emulsioni di olio in acqua in un'ampia gamma di condizioni. Importante ricordare come le mannoproteine hanno mantenuto la loro attività emulsionante anche dopo il riscaldamento a 121°C indicando che il loro utilizzo può essere sfruttato per la lavorazione degli alimenti. Attraverso l'utilizzo di una frazione di MP, sfruttando la loro capacità emulsionante, è stato possibile produrre la maionese. Per verificare le differenze delle proprietà emulsionanti e stabilizzanti tra il prodotto commerciale e il prodotto descritto con il metodo precedente, è stato effettuato un confronto che ha dimostrato le loro simili proprietà. In enologia, i preparati di mannoproteine vengono venduti soprattutto per la loro attività protettiva contro le precipitazioni di tartarato nei vini rossi e nei vini bianchi che causano le principali formazioni di sedimenti nel vino in bottiglia, con un impatto importante sulla commercialità del vino (Guise et al., 2014). L'effetto delle MP contro le

precipitazioni è dovuto alla loro azione colloidale protettiva che consente di ridurre significativamente la nucleazione e la crescita dei cristalli (Gerbaud, Gabas, Blouin e Crachereau, 2010; Guise et al 2014; Moine-Ledoux & Dubourdieu, 2002). Nonostante recenti studi abbiano dimostrato come l'uso di MP sia costoso e spesso non sufficiente a stabilizzare completamente il vino, la sua diffusione è stata autorizzata dall'unione europea e dall'Organizzazione Internazionale del Vino e della Vite. L'OIV riconosce anche l'attività protettiva contro la formazione di torbidità proteica nei vini. La forma più comune di torbidità riscontrata nei vini bianchi è dovuta all'aggregazione delle proteine del vino durante la conservazione, fenomeno generalmente evitato grazie all'utilizzo della bentonite. Tuttavia, l'esatto meccanismo utilizzato dalle MP rimane poco chiaro. Nel campo dell'enologia è noto anche il ruolo che rivestono le MP sulla presa di schiuma del vino. Infatti, sono in grado adsorbirsi sull'interfaccia liquido/aria, ridurre la tensione superficiale del vino e aumentarne la viscosità ritardando così il drenaggio delle pareti delle bolle portando ad una maggiore stabilità della schiuma. Importante è anche il metodo con cui viene eseguita l'estrazione delle mannoproteine che ha un ruolo cruciale nel determinare la loro funzionalità.

1.5 I metodi d'estrazione

Esistono essenzialmente due metodologie di estrazione delle proteine. Si basano sull'utilizzo di enzimi in grado di degradare le pareti cellulari del lievito oppure su trattamenti fisici. In particolare, l'estrazione effettuata con il metodo enzimatico viene utilizzato per applicazioni di tipo enologico, invece il metodo che sfrutta i trattamenti fisici è impiegato soprattutto per applicazioni di tipo alimentare.

1.5.1 Metodo d'estrazione delle proteine

Per quanto riguarda l'estrazione delle proteine l'approccio enzimatico utilizza preparati contenenti attività beta-glucanasi in grado di modificare la parete

cellulare del lievito consentendo il rilascio di MP nella fase liquida (De Iseppi et al., 2020). Si possono utilizzare diversi tipi di beta-glucanasi con l'ottenimento di risultati differenti. In particolare, l'impiego di Glucanex ha portato a risultati incoraggianti come agente protettivo nei confronti della formazione di torbidità proteica principalmente nei vini bianchi (Lomolino e Curioni 2007). Tuttavia, l'utilizzo delle molteplici beta-glucanasi non consente il recupero contemporaneo di beta-glucani funzionali in quanto vengono degradati enzimaticamente durante l'estrazione.

I protocolli fisici nella maggior parte dei casi usano il trattamento delle cellule di lievito in autoclave, per un tempo che varia da una a quattro ore ad una temperatura costante di 121°C, così le proteine precipitano dalla fase liquida mediante aggiunta di etanolo ed infine l'estratto viene liofilizzato. A differenza del metodo descritto precedentemente, l'estrazione eseguita con trattamenti di tipo fisico permette di non degradare i beta-glucani. Il trattamento in autoclave è una tecnica ampiamente diffusa a livello industriale. Le proteine estratte con quest'ultimo metodo hanno mostrato risultati incoraggianti nella stabilizzazione dell'emulsione e nell'aumento della schiuma del vino, ma non nella prevenzione della formazione di torbidità proteica nel vino, dove le proteine estratte enzimaticamente hanno prestazioni migliori. Recenti studi hanno dimostrato che sostituendo l'etanolo, impiegato per la precipitazione delle proteine, con una fase di dialisi ha permesso l'inclusione di beta-glucani solubili negli estratti finali ottenendo un miglioramento della stabilità dell'emulsione (De Iseppi et al. 2019).

1.6 Formazione delle fecce

Un altro sottoprodotto che si ottiene in grande quantità durante il processo di vinificazione è la feccia che possiede una composizione simile a quella delle borlande essendo costituita da quantità significative di polisaccaridi, proteine, lipidi e altre sostanze organiche che necessitano di un'elevata richiesta di

ossigeno. Si accumulano sul fondo dei vasi vinari dopo la fermentazione alcolica e nelle settimane successive ad essa. Vista la composizione molto simile alle borlande, il riutilizzo delle fecce può essere sfruttato attraverso i processi precedentemente descritti. Oltre a questi, le fecce possono essere utilizzate anche per altri scopi sia nell'industria alimentare che in quella enologica.

1.6.1 Valorizzazione delle fecce

Il quantitativo di polifenoli presenti è tra 1,9 g e 16,3 g di *polifenoli/Kg* (Bustamante et al. 2008) ed attraverso i processi di estrazione possono essere sfruttati nell'industria alimentare come additivi naturali antiossidanti e antimicrobici (Jara-Palacios, 2019). Il processo può essere effettuato mediante solventi organici per uso alimentare, CO₂ supercritica e tecnologie a membrana grazie allo sfruttamento delle deboli forze di Van der Waal che si instaurano tra i polifenoli colloidali e le proteine delle scorze alimentari. Per quanto riguarda la parte lipidica delle fecce, provenienti dai vinaccioli e dalle pareti cellulari del lievito, si possono estrarre acidi grassi di alto valore come il palmitico, il linoleico e lo stearico attraverso l'uso di solventi non alimentari. Il primo tentativo di estrazione di lipidi attraverso l'impiego di solventi alimentari è stato effettuato per ottenere lo squalene utilizzando un'estrazione con esano assistito da ultrasuoni. Un altro utilizzo riguardante le fecce è finalizzato al recupero di acido tartarico. Esso viene utilizzato in molti ambiti da, quello alimentare per la produzione di bevande fino a quello nell'industria farmaceutica, cosmetica e chimica come acidificante. Si stima che il consumo globale sia intorno alle 28.000 tonnellate l'anno con il raggiungimento di prezzo medio di 3000 US\$/tonnellata (Zorn & Czermak, 2010). Il recupero prevede l'appassimento delle fecce e la successiva solubilizzazione del bitartrato di potassio utilizzando acqua a 70°C. Successivamente, dopo la rimozione delle parti solide delle fecce, vengono aggiunti dei sali di calcio per indurre la precipitazione di tartrato di calcio. Quest'ultimo viene decomposto utilizzando acido solforico per ottenere acido

tartarico solubilizzato e sali insolubili di solfato di calcio. Dopo la purificazione e la decolorazione, la soluzione acida viene concentrata e l'acido tartarico solido cristallizza. Esistono anche altri metodi per estrarre acido tartarico mediante dissoluzione con HCl e precipitazione di CaCl_2 . Tuttavia, con questo metodo si ottiene solfato di calcio che è dannoso all'ambiente. Per ridurre queste produzioni di sostanze dannose recenti studi hanno utilizzato acqua acidificata e resine per lo scambio cationico per legare gli ioni K e solubilizzare l'acido tartarico a temperatura ambiente.

2. SCOPO DELLA TESI

Attraverso la sperimentazione condotta, in questo studio ci si propone di effettuare alcune considerazioni propedeutiche allo scale-up per una procedura di estrazione delle proteine dalle borlande validata in laboratorio. Per poter effettuare queste considerazioni è necessario valutare l'estrazione delle proteine in diverse condizioni operative (tempo, temperatura e concentrazione delle borlande). È necessario inoltre determinare alcune proprietà fisiche delle borlande concentrate quali la viscosità, la densità ed il calore specifico. I risultati delle concentrazioni di proteine ottenute dai diversi campioni, mediante l'impiego di trattamenti fisici, sono stati confrontati con i valori ottenuti dalla procedura validata in laboratorio.

3. MATERIALI E METODI

La materia prima utilizzata per questo studio deriva dalla Distilleria Castagner, situata a Vazzola in provincia di Treviso. Nata nel 1996, è diventata oggi una realtà riconosciuta per essere tra le più innovative ed avanzate nel proprio settore nella ricerca di nuovi metodi di distillazione e nella valorizzazione dei sottoprodotti formati. Il lavoro, per questa sperimentazione, si è svolto in due mesi tra i laboratori di enologia dell'università di Padova a Conegliano e in quelli situati a Legnaro all'interno del campus di Agripolis.

3.1 Preparazione dei campioni

Per la prima fase di laboratorio, effettuata a Conegliano, si è proceduto a preparare i 15 campioni aventi diverse caratteristiche di concentrazione, espressa in % di particelle solide, tempo di cottura e temperatura. Inoltre, tra essi sono stati preparati 3 campioni in cui temperatura, tempo e concentrazione sono stati replicati (punto centrale dello schema sperimentale). L'ordine di preparazione dei campioni è stato scelto in maniera del tutto casuale, ad eccezione fatta per i tre campioni con le stesse caratteristiche che sono stati preparati ad un intervallo di 4 preparazioni, quindi in posizione 4, 8 e 12. Lo strumento adoperato per questa fase consiste nell'uso di una comune pentola a pressione utilizzata in cucina per la preparazione di alimenti. Essa permette di regolare diverse proprietà fisiche: la capacità di variare la pressione e quindi modificare a sua volta la temperatura, la possibilità di inserire un tempo differente a seconda dell'obiettivo che si vuole raggiungere. Per i 15 campioni preparati la scelta della temperatura è ricaduta nell'utilizzo di valori pari a 104°C , 108°C e 112°C a cui si associano rispettivamente al primo valore una pressione bassa, al secondo una pressione media e al terzo una pressione alta. Invece, per la variabile tempo, sono stati impiegati 20, 40 e 60 minuti per la realizzazione dei campioni. Anche in questo

caso, la scelta nell'attribuire i valori tempo ai preparati è avvenuta seguendo uno schema casuale. L'ultimo parametro che diversifica i campioni preparati riguarda la concentrazione di particelle solide contenute all'interno delle borlande. I valori utilizzati, espressi percentualmente, sono stati scelti attribuendo una prima misura del 10% (valore standard delle borlande che si ottengono dopo il processo di distillazione), seguita da valori del 30% e 50%. Nello specifico, sono stati preparati 7 campioni con concentrazione del 30%, 4 con concentrazione del 10% e lo stesso dicasi per quelli al 50%. Una volta create le combinazioni dei parametri adoperati per i campioni considerando anche il T₀ (borlanda pura che non ha subito nessun trattamento fisico) e Autoclave, come descritto nella tabella 1, si è proceduto ad ottenere dalla materia prima le concentrazioni necessarie.

Tabella 1 - Disegno sperimentale utilizzato

N. Campioni	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Conc. (%)
1	104	20	30
2	112	20	30
3	104	60	30
4	112	60	30
5	104	40	10
6	112	40	10
7	104	40	50
8	112	40	50
9	108	20	10
10	108	60	10
11	108	20	50
12	108	60	50
13	108	40	30
14	108	40	30
15	108	40	30
T₀	-	-	10
Autoclave	121	20	10

Per fare ciò, tenendo in considerazione che il prodotto di partenza possedeva una concentrazione di particelle solide del 10,8% a temperatura ambiente, si è optato

per creare delle porzioni di borlande di 1,2 L contenenti quindi 12,96 g di particelle solide. Per ottenere la concentrazione pari al 30% sono state prese le parti solide contenute in due porzioni da 1,2 L e aggiunte ad una porzione contenente sempre 1,2 L; alla stessa maniera per ottenere una concentrazione del 50% sono state prese le parti solide contenute in quattro porzioni da 1,2 L e aggiunte ad una porzione contenente sempre 1,2 L. Per estrarre la quantità di particelle solide dalla borlanda di partenza sono stati utilizzati dei flaconi di plastica contenenti ciascuno circa 90 ml (per complessivi 1,2 L). Successivamente, 4 recipienti alla volta sono stati inseriti all'interno della crociera di una centrifuga facendo attenzione a disporli a coppie di pari peso per evitare lo sbilanciamento della macchina che comporterebbe un risultato non soddisfacente. La centrifuga è stata impostata utilizzando una forza centrifuga relativa (RCF) di 15000, per un tempo di 15 minuti ad una temperatura di 18°C. Una volta ottenuta la separazione della parte solida da quella liquida, quest'ultima è stata eliminata mentre quella solida è stata sciolta all'interno della porzione di borlanda non destinata alla centrifugazione. Successivamente si è proceduto a inserire il quantitativo di borlanda alla concentrazione desiderata all'interno della pentola a pressione (fig.1) stabilendo la temperatura e il tempo



Fig. 1 - Pentola a pressione

di cottura desiderati. Al termine della cottura, si è lasciata raffreddare la borlanda all'interno della pentola aperta e successivamente si è travasata completamente in un matraccio. Per evitare eventuali contaminazioni da agenti esterni e l'evaporazione della sostanza si è

proceduto a sigillarla con carta stagnola. Una volta raffreddata completamente, la borlanda è stata inserita in parte all'interno di una bottiglietta di plastica da 500 ml ed in parte in una provetta di plastica da 100 ml. Il contenuto della

bottiglietta sarà utilizzato per il calcolo di proprietà fisiche come viscosità, densità e calore specifico, mentre quello all'interno della provetta sarà destinato per il calcolo delle concentrazioni di proteine. A questi 15 campioni ne è stato aggiunto uno ottenuto mediante un'estrazione condotta in autoclave utilizzando un campione con concentrazione al 10%, ad una temperatura di 121°C e per un tempo di 20 minuti.

3.2 Determinazione delle proprietà fisiche

Una volta ottenuti i campioni si è proceduto ad analizzare le loro proprietà fisiche quali viscosità, densità e calore specifico. Questa seconda fase è stata eseguita all'interno dei laboratori del Campus di Agraria a Legnaro.

3.2.1 Viscosità e Densità

Per ottenere i valori di viscosità è stato utilizzato come strumento un viscosimetro modello ViscoQC 300-L dell'azienda "Anton Paar" (fig.2) in grado di registrare

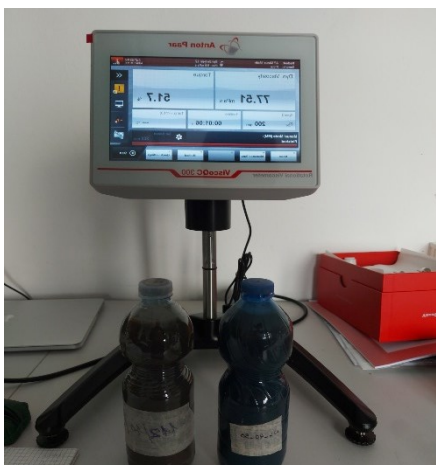


Fig. 2 - Viscosimetro

intervalli di viscosità tra 1 $mPa \cdot s$ e 6.000.000 $mPa \cdot s$. Per il calcolo della viscosità sono stati utilizzati 4 tipi di giranti (spindle) scelti a seconda del grado di fluidità della borlanda.

Secondo la casa produttrice, per permettere la stabilizzazione del valore lo strumento deve eseguire l'analisi per almeno un minuto. Il collegamento tra spindle e strumento è posto alla base dello stesso e avviene grazie ad un magnete. Lo spindle utilizzato per i fluidi di minore viscosità è costituito da un cilindro che si sviluppa per quasi l'intera lunghezza dell'asta verticale. Progressivamente all'aumentare della viscosità si adoperano spindles con un cilindro sempre più piccolo, fino ad arrivare all'ultimo che è costituito dalla sola asta di metallo. Prima di passare all'analisi dei

campioni, è stata curata la calibrazione dello strumento mediante prove di differenti liquidi con diverse viscosità capendo per quali intervalli doveva essere utilizzato uno spindle al posto di un altro. Per effettuare questa verifica, si mettono in relazione i valori forniti dallo strumento di viscosità e di coppia meccanica indicati rispettivamente a sinistra e a destra dello schermo (fig.3): il primo a sinistra è il valore di viscosità espressa in $mPa \cdot s$, mentre il secondo è il valore del momento meccanico espresso in percentuale. Se la misura ottenuta nel riquadro di destra supera il 10%, il valore calcolato di viscosità può essere considerato attendibile; se invece risulta essere inferiore al 10% il valore di viscosità ottenuto non può essere considerato attendibile e quindi lo spindle deve essere



Fig.3 - Funzionamento viscosimetro

sostituito con un altro tra quelli a disposizione. Successivamente sono stati analizzati i vari campioni di borlanda partendo dal T_0 (campione che non ha subito nessun trattamento fisico) e seguendo l'aumento di temperatura di cottura a parità di concentrazione di particelle solide; ad essi è stato aggiunto il campione ottenuto dall'autoclave del laboratorio (tabella 2).

Tabella 2 – Ordine dei campioni per analisi della viscosità e densità

Campioni	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Conc. (%)
1	104	40	10
2	108	20	10
3	108	60	10
4	112	40	10
5	104	20	30
6	104	60	30
7	108	40	30
8	108	40	30
9	108	40	30
10	112	20	30
11	112	60	30
12	104	40	50
13	108	20	50
14	108	60	50
15	112	40	50

Per tutti i campioni analizzati è stata utilizzata una velocità di rotazione degli spindle pari a 200 *rpm* per un tempo costante di 1 minuto; sul campione 7 e 15, della tabella 2, si è proceduto inoltre ad analizzare il comportamento reologico del fluido osservando come variava la viscosità all'aumentare della velocità in un intervallo compreso tra i 150 *rpm* e i 220 *rpm* mantenendo sempre costante il tempo per un minuto. Per effettuare tutte le analisi, è stato travasato per ogni campione il quantitativo di borlanda contenuta in una singola bottiglietta all'interno di un becher e una volta collegato lo spindle corretto è stato avviato lo strumento alle condizioni precedentemente descritte.

Per la determinazione della proprietà fisica della densità dei n.15 campioni è stata adoperata una bilancia per il calcolo della massa di ciascun campione. Si è scelto di utilizzare una beuta da 100 *ml* che, dopo aver azzerato la tara, è stata riempita con la borlanda portandola a volume con una pipetta e successivamente pesata.

La densità è stata calcolata utilizzando la formula $d = \frac{m}{V}$ trasformando le unità di misura da ml a L e da g a Kg .

3.2.2 Calore specifico

Il calorimetro di Regnault (o delle mescolanze) è un apparato sperimentale che permette di misurare le proprietà termiche delle sostanze come il calore specifico, nonché le quantità di calore ceduto o assorbito durante un processo fisico o chimico. Lo strumento è costituito da un ambiente isolato termicamente dall'esterno, nel quale si fanno avvenire processi termodinamici controllando le variazioni della temperatura interna durante le varie fasi del processo. La formula utilizzata in generale per il calcolo del calore specifico è: $C_S = \frac{Q}{\Delta T * m}$ dove Q rappresenta la quantità di calore ceduta dal corpo di massa m quando la temperatura diminuisce di ΔT gradi. Il calore specifico indica la quantità di calore, espressa in $J/Kg * K$, necessaria per innalzare di $1^\circ C$ $1 Kg$ della sostanza presa in esame.

Per il secondo principio della termodinamica si può eguagliare il calore assorbito dal liquido e il calore ceduto dall'oggetto in esso immerso: una volta scaldato il campione ed introdotto all'interno del calorimetro, questo cederà calore al liquido presente fino a quando le due temperature coincideranno potendo così determinare il calore specifico del liquido utilizzato. Il calore assorbito dall'acqua equivale a $Q_L = C_{S_L} * m_L * (t_E - t_L)$, mentre il calore ceduto dall'oggetto equivale a $Q_O = C_{S_O} * m_O * (t_O - t_E)$. Eguagliando le due formule si potrà ricavare il calore specifico del liquido (C_{S_L}) ottenendo: $C_{S_L} = \frac{C_{S_O} * m_O * (t_O - t_E)}{m_L * (t_O - t_E)}$ in cui m_O è la massa dell'oggetto campione, t_O la temperatura dell'oggetto, t_L la temperatura del liquido, m_L la massa del liquido e t_E la temperatura di equilibrio. In questo studio, per ottenere i valori necessari per il calcolo del calore specifico dei diversi campioni di borlanda, è stato utilizzato come calorimetro un termos. Come oggetto del campione si è scelto di utilizzare 6 cilindri di acciaio inox avente

un valore di calore specifico pari a $502 \text{ J/K} \cdot \text{kg}$ (CS_O) con una massa di circa 300 g (m_O). I cilindri tra loro presentano una leggera differenza di peso che comunque risulta essere ininfluenza ai fini pratici dello studio. Per determinare le varie differenze di temperatura è stato effettuato un foro sul tappo del thermos ed inserito al suo interno una sonda. Il primo passaggio è consistito nell'inserire i cilindri di acciaio nel forno fino al raggiungimento di una temperatura di 60°C (t_O). Poco prima di raggiungere la temperatura desiderata dei cilindri, sono stati presi i 17 campioni dal frigo (considerando anche il T_0 e Autoclave) e inseriti una alla volta all'interno del thermos; attraverso la sonda si è potuto misurare il loro valore di t_L che è risultato essere ad una temperatura di circa 10°C . Una volta raggiunta la temperatura di 60°C , un cilindro, scelto in maniera casuale, è stato inserito nel thermos attraverso il foro creato in precedenza. Per determinare la temperatura di equilibrio si è proceduto a shakerare il thermos, contenente sia il campione che il cilindro, fino a quando la temperatura del liquido non aumentava più determinando così la temperatura di equilibrio (t_E). Prima di procedere all'analisi del campione successivo è stato pesato il cilindro utilizzato per determinare la massa dell'oggetto m_O . Infine, per ottenere la misura del calore specifico di ciascun campione è stata utilizzata la formula descritta precedentemente.

3.3 Prima fase di determinazione delle proteine

La determinazione delle concentrazioni di proteine contenute all'interno delle borlande è stata eseguita nel Campus di agraria a Legnaro all'interno dei laboratori del dipartimento DAFNAE (Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente).

Inizialmente, considerando i 15 campioni e ad essi aggiungendo il T_0 (campione in cui non è stato eseguito alcun trattamento fisico) e quello ottenuto mediante l'estrazione in autoclave, sono stati prelevati parte del contenuto e posti

all'interno di nuove provette falcons aventi dimensioni minori attribuendo lo stesso nome per identificarle nelle fasi successive. Per eseguire questa operazione sono stati prelevati 24 *ml* per le concentrazioni da 50%, 18 *ml* per le concentrazioni da 30% e 11 *ml* per le concentrazioni da 10%. Successivamente le falcons sono state inserite all'interno di una crociera di una centrifuga disposte a coppie di pari peso ad una velocità di 5000 *rpm*, ad una temperatura di 18°C e per un tempo di 15 minuti per permettere alle particelle solide con peso molecolare superiore alle proteine di depositarsi nel fondo del contenitore. La scelta di prelevare quantità diverse di borlanda per le varie concentrazioni è dovuta al fatto che ad una maggiore concentrazione di particelle solide corrisponde un maggiore quantitativo che si depositerà nel fondo e quindi, utilizzando un pari volume di fluido, a concentrazioni maggiori il liquido sarebbe rimasto in minor quantità rispetto alle concentrazioni minori. Dopo aver eseguito la centrifuga, dal contenuto di ciascuna falcon sono stati prelevati 3 *ml* e distribuiti in maniera uguale su 3 eppendorf aventi un volume pari a 1.5 *ml*. Inoltre, ogni trio di eppendorf per la determinazione di proteine di ciascun campione sono stati rinominati rispettivamente con le lettere A, B e C. Si sono ottenute così, partendo da 17 falcons, 51 eppendorf per determinare la concentrazione di proteine (fig.4).

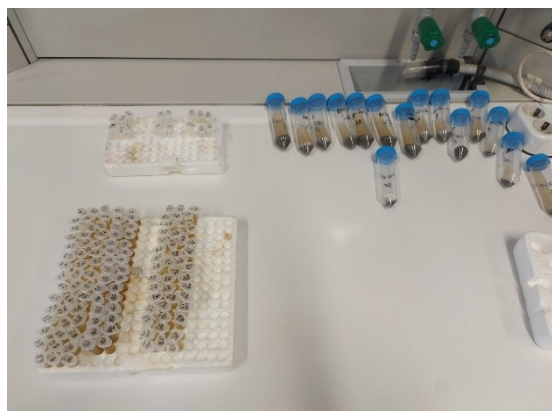


Figura 4 - Eppendorf

3.3.1 Determinazione delle proteine

La determinazione delle proteine è stata ottenuta mediante l'utilizzo del kit BCA prodotto da "ThermoFisher Scientific". Il test BCA è un saggio colorimetrico che misura il quantitativo di proteine totali tramite cambiamento di colore per la presenza di una reazione di riduzione del rame da Cu^{2+} a Cu^+ in un ambiente di tipo alcalino. La rilevazione colorimetrica del catione rameoso (Cu^+) è altamente sensibile, selettiva ed avviene per la presenza dell'acido bicinconinico. La prima fase consiste nella chelazione del rame con le proteine. In questa reazione, nota come reazione del biureto, i peptidi contenenti tre o più residui amminoacidici formano un complesso chelato colorato con gli ioni rameici. Nella seconda fase della reazione di sviluppo del colore, il BCA reagisce con il catione ridotto formatosi nella prima fase. Il prodotto di reazione, di colore viola intenso, deriva dalla chelazione di due molecole di BCA con uno ione rameoso. Il complesso BCA/rame è solubile in acqua e presenta una forte assorbanza lineare a 562 nm con concentrazioni crescenti di proteine. Il valore di assorbanza ottenuta è in realtà una misurazione indiretta poiché effettivamente si misura la quantità di rame ridotto che dipende dalla quantità di proteine totali. All'interno del kit sono presenti: dell'albumina denominata albumina sierica bovina (BSA) in uno stock di concentrazione iniziale pari a 2 g/L utilizzata per ottenere la retta di taratura e due reagenti, uno denominato con la lettera A e il secondo denominato con la lettera B utilizzati in un rapporto del 2% per ottenere il reagente di lavoro (WR). Esso permette, in presenza di proteine, di virare il suo colore da verdemare a un viola più o meno intenso. Per prima cosa sono state preparate 12 eppendorf contenenti all'interno diverse diluizioni dell'albumina. Le diluizioni utilizzate per ottenere la retta di taratura sono riportate nella tabella 3.

Tabella 3 – Valori di concentrazione per stabilire retta di taratura

Lettera eppendorf	H ₂ O (μ l)	Stock e diluizione (μ l)
A	0	150
B	125	375
C	325	325
D	175	175 di dil. di B
E	325	325 di dil. di C
F	325	325 di dil. di E
G	325	325 di dil. di F
H	400	100 di dil. di G
I	150	150 di dil. di H
L	150	150 di dil. di I
M	150	150 di dil di L
N	400	0

Per la preparazione del reagente WR è stata presa una quantità pari a 10 ml del reagente A e aggiunti 0,2 ml del reagente B ottenendo una soluzione di 10,2 ml di WR. Successivamente, attraverso l'impiego di pipette a microlitri di diversa capacità, è stata creata la prima piastra per ottenere la retta di calibrazione. Per ogni eppendorf contenente le diluzioni di albumina sono stati utilizzati tre pozzetti della piastra ottenendo, per tutte le eppendorf, un totale di 36 prove (12·3). All'interno di ciascun pozzetto è stato inserito un quantitativo di 25 μ l proveniente dalle eppendorf addizionato con 200 μ l di reagente proveniente dal WR (fig.5). Una volta completata la preparazione mediante l'uso di pipette a

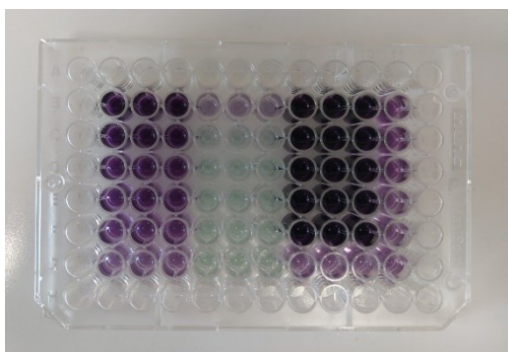


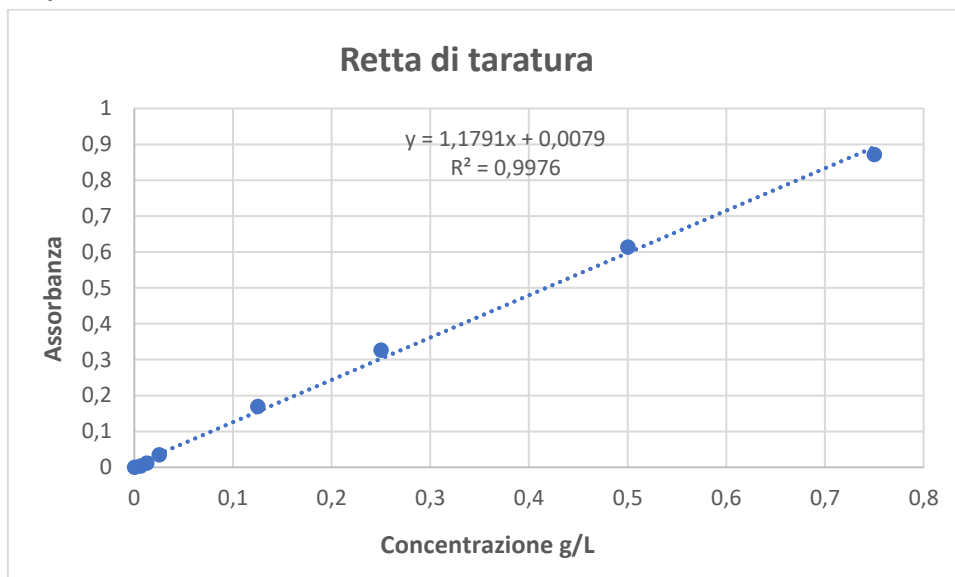
Fig.5 - Piastra per retta di taratura

microlitri, la piastra è stata inserita all'interno di uno spettrofotometro per la misurazione dell'assorbanza a diversi livelli di concentrazione di albumina sierica bovina con l'obiettivo di ottenere la retta di taratura.

Lo spettrofotometro è stato impostato ad una temperatura di 37°C, per un tempo di 30 minuti con una shakerata di 30 secondi all'inizio e alla fine del processo. I

dati ottenuti dallo strumento sono stati riportati al PC grazie ad un software per collegamento diretto. In questa maniera è stato possibile individuare la retta di taratura come descritta dal grafico sotto riportato.

Grafico 1 – Retta di taratura



Sull'asse delle ascisse è espressa la concentrazione in g/L di albumina mentre sull'asse delle ordinate il valore d'assorbanza delle prove. L'asse delle ordinate è stato costruito calcolando la media dei tre valori di ciascuna diluizione ottenuti dallo spettrofotometro a cui è stato sottratto il "bianco", cioè la media dei tre valori della prova di diluizione non contenente albumina. Per quanto riguarda l'asse delle ascisse i valori utilizzati fanno riferimento alla concentrazione espressa in g/L partendo dalla concentrazione originale di $2 g/L$ e rapportati a valori minori corrispondenti alle diluizioni successive. Una volta misurate tutte le assorbanze associate alle concentrazioni di proteine è stato possibile ottenere dei punti all'interno del grafico. Attraverso l'utilizzo di essi si è costruita una retta di regressione, cioè quella retta che passa il più vicino possibile a tutti i punti e con il software di calcolo utilizzato si è determinato il parametro R^2 . Esso quando raggiunge valori vicino a 1, indica la precisione assoluta dei dati ottenuti per la costruzione della retta. In questo caso, considerando i valori ottenuti dalle

concentrazioni di albumina compresi in un intervallo tra 0 e tra 0,8 è stato possibile costruire una retta avente un R^2 molto prossimo a 1.

Successivamente, vedendo l'elevato quantitativo di concentrazione di proteine contenute nelle eppendorf dei vari campioni da analizzare, è stato necessario diluirli per permettere di leggere le assorbanze allo spettrofotometro. Quindi da ogni eppendorf è stato prelevato $10 \mu l$ di campione e inserito all'interno di nuove eppendorf con l'aggiunta di $190 \mu l$ di H_2O ottenendo una soluzione di $200 \mu l$ ($0,2 ml$). Una volta ottenute le diluzioni è stata presa una nuova piastra e posti all'interno dei pozzetti tutti i campioni da analizzare prelevando un quantitativo di volume pari a $25 \mu l$. Ad ognuno di essi è stato aggiunto anche $200 \mu l$ di reagente WR. Dopo la lettura delle assorbanze da parte dello strumento, attraverso l'utilizzo dell'equazione della retta di taratura, si sono calcolati i valori di tutte le concentrazioni delle proteine contenute all'interno dei campioni. La formula che definisce l'equazione di una retta è $y = mx + q$ e, considerando l'equazione della retta di taratura utilizzata in questo studio, è stato possibile ottenere le concentrazioni reali di proteine sostituendo a y il valore di assorbanza misurato dallo spettrofotometro ricavando quindi la x . Anche in questo caso, a tutti i valori di assorbanza è stato sottratto il quantitativo di "bianco" (diluzione non contenente albumina) prima di procedere al calcolo delle concentrazioni. Per tutte le assorbanze è stata calcolata inoltre la deviazione standard per capire se le tre misure di assorbanza di ogni campione rientravano in un range accettabile. In questo studio è stato considerato valido un valore massimo del 10%, per cui se si otteneva un valore superiore la procedura è stata rifatta.

3.4 Analisi Statistica

I risultati ottenuti sono stati modellizzati utilizzando la Response Surface Methodology (RSM). Questa tecnica ha permesso di valutare la significatività dei termini di primo ordine, di secondo ordine e la interazione di temperatura, tempo e concentrazione. La validità dei modelli è stata valutata mediante la lack of fit e la significatività del modello complessivo.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Proteine

Le analisi effettuate su 16 campioni (considerando anche T₀) per determinare le concentrazioni di proteine contenute nelle borlande, dopo che esse hanno subito un'estrazione mediante trattamento fisico a diverse condizioni di temperatura, tempo e concentrazione, sono state confrontate con i dati ottenuti da un'analisi di un campione in cui è stata condotta un'estrazione in autoclave a condizioni standard (Tabella 4).

Tabella 4 – Campioni costruiti a diverse condizioni di parametri

N. Campioni	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Conc. (%)
1	104	20	30
2	112	20	30
3	104	60	30
4	112	60	30
5	104	40	10
6	112	40	10
7	104	40	50
8	112	40	50
9	108	20	10
10	108	60	10
11	108	20	50
12	108	60	50
13	108	40	30
14	108	40	30
15	108	40	30
T₀	-	-	10
Autoclave	121	20	10

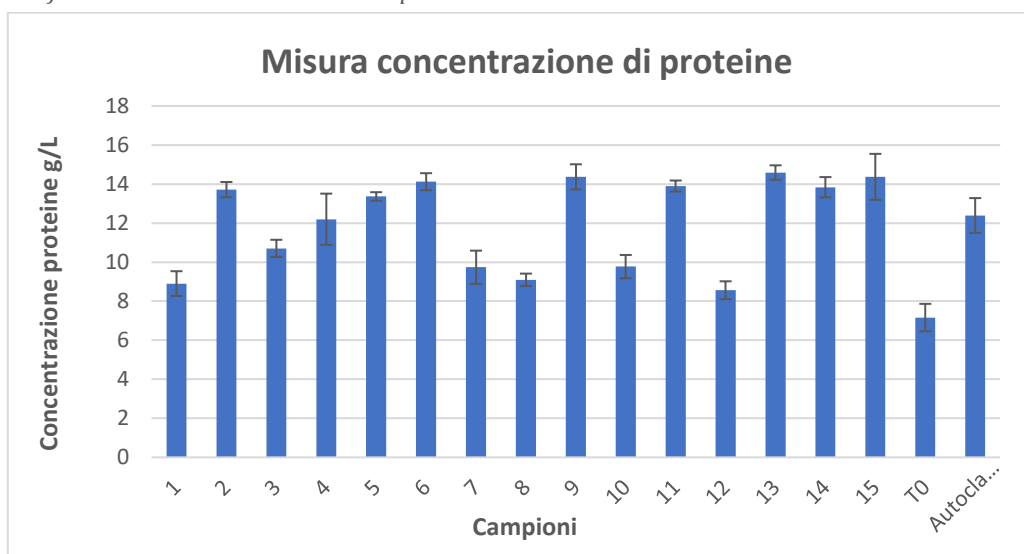
Attraverso l'analisi dei dati ottenuti, come si evince dalla tabella 5 e dal grafico 2 successivamente riportati, si è riscontrato che tra tutti i campioni il valore più simile di concentrazione di proteine rispetto a quello ottenuto mediante

un'estrazione condotta in autoclave con una concentrazione di 12,39 g/L, è stato ottenuto dal campione n.4 ($T=112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t=60\text{ min}$, conc.30%) che fornisce un valore di concentrazione pari a 12,20 g/L. I campioni invece che hanno rilevato una concentrazione maggiore rispetto all'estrazione condotta in autoclave sono stati i campioni 2, 5, 6, 9, 11, 13, 14 e 15 rispettivamente con concentrazioni pari a 13,71 g/L, 13,36 g/L, 14,12 g/L, 14,37 g/L, 14,59 g/L, 13,84 g/L, 14,37 g/L. Tendenzialmente, attraverso il confronto dei risultati delle analisi, si è potuto constatare che le estrazioni con una maggiore concentrazione di proteine sono state eseguite partendo da una concentrazione del 30% di particelle solide; buoni risultati sono stati ottenuti anche mediante l'utilizzo di concentrazione pari al 10%. Per quanto riguarda invece le estrazioni condotte con una concentrazione del 50%, i dati raccolti hanno fornito in media risultati molto inferiori rispetto a quelli ottenuti in autoclave, per cui un'eventuale estrazione eseguita con questa concentrazione non consentirebbe di ottenere i risultati sperati. Attraverso sempre l'analisi dei dati ottenuti si può constatare che tendenzialmente l'utilizzo di un tempo di 60 minuti fornisce dei valori di concentrazione più bassi rispetto all'utilizzo di un tempo pari a 20 e 40 minuti che sembrano portare invece a risultati migliori. Per quanto riguarda l'analisi dei risultati della temperatura da impressione che l'incidenza della variazione possa tendenzialmente estrarre un maggiore quantitativo di proteine utilizzando una temperatura tra i 108°C e i 112°C . Il calcolo effettuato per essere a conoscenza dell'errore presente nella misura della concentrazione di proteine, ottenute dai campioni 13, 14 e 15 costruiti con i medesimi parametri di temperatura, tempo di cottura e concentrazione, risulta essere pari a circa il 3%.

Tabella 5 - Valori di concentrazione di proteine

N. Campioni	Concentrazione proteine (g/L)	Deviazione standard
1	8,9	0,63
2	13,71	0,39
3	10,7	0,44
4	12,2	1,31
5	13,36	0,22
6	14,12	0,44
7	9,74	0,85
8	9,09	0,32
9	14,37	0,64
10	9,77	0,6
11	13,9	0,28
12	8,56	0,46
13	14,59	0,37
14	13,84	0,52
15	14,37	1,18
T ₀	7,16	0,7
Autoclave	12,39	0,89

Grafico 2 - Valori di concentrazione di proteine



Inoltre, attraverso la creazione del disegno sperimentale a curve di livello (Response surface methodology) è stato possibile individuare dei valori, per ciascuno dei parametri considerati in questo studio (temperatura, tempo di cottura e concentrazione), con l'obiettivo di ottenere l'estrazione migliore per avere una concentrazione maggiore di proteine. In questo caso il valore di temperatura ottimale è risultato essere pari a 110°C , con un tempo di cottura pari a 29,3 minuti e utilizzando una concentrazione al 18,7% di particelle solide come descritto nella sottostante figura 6.

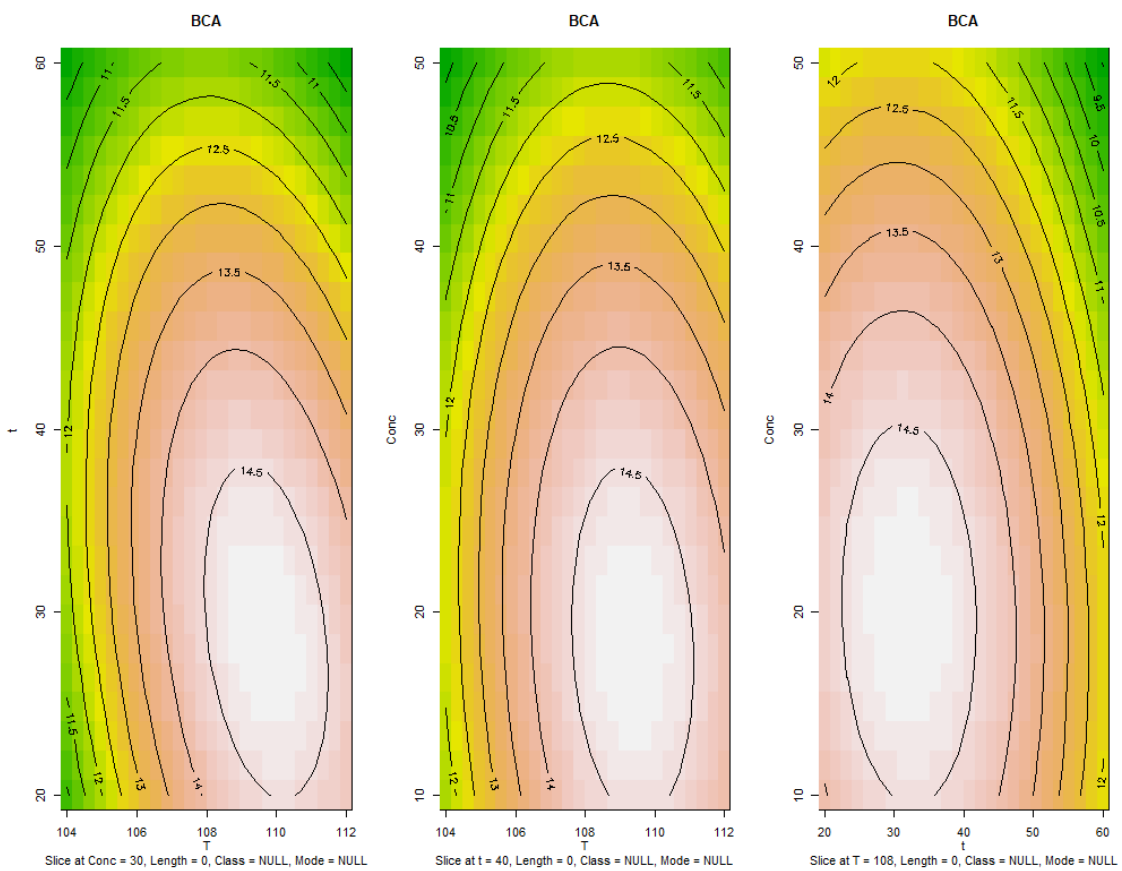


Fig. 6 – Response surface methodology (RSM)

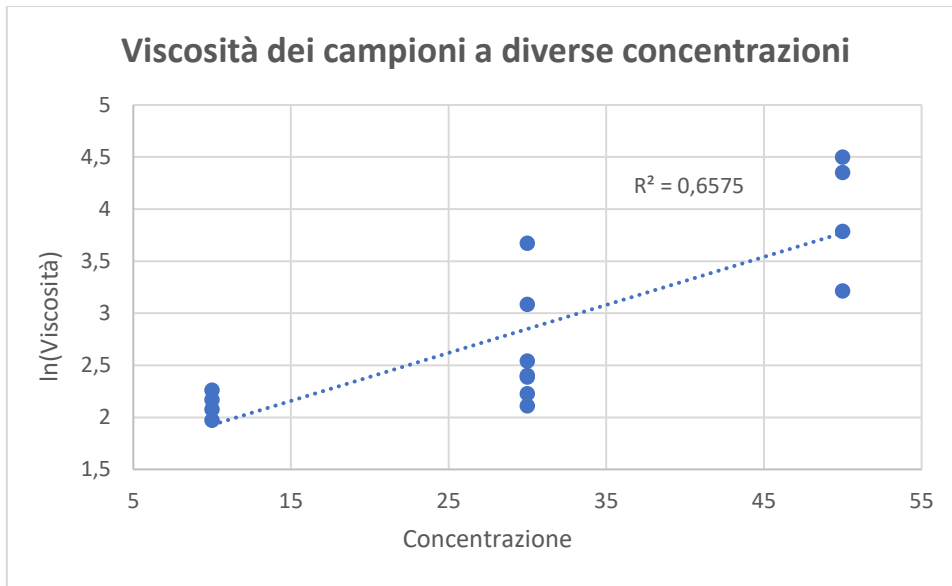
4.2 Viscosità

Attraverso l'analisi della viscosità effettuata sui 17 campioni (considerando anche l'autoclave e il T₀) si è voluto analizzare come essa varia a concentrazioni diverse di particelle solide. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 6 e nel grafico 3. Dall'analisi statistica è stato messo in evidenza un effetto statisticamente significativo della concentrazione sulla viscosità. La relazione, coerentemente con quanto riportato in letteratura (Friso, 2018) è di tipo esponenziale. L'analisi effettuata per determinare la viscosità di ciascun campione è stata eseguita impostando una velocità pari a 200 rpm.

Tabella 6 - Valori di viscosità dei campioni

N. Campioni	Temp. (°C)	Tempo (min)	Conc. (%)	rpm	Viscosità (mPa.s)
1	104	40	10	200	7,166
2	108	20	10	200	8,725
3	108	60	10	200	7,976
4	112	40	10	200	9,595
5	104	20	30	200	21,860
6	104	60	30	200	12,680
7	108	40	30	200	8,246
8	108	40	30	200	9,265
9	108	40	30	200	10,880
10	112	20	30	200	11,030
11	112	60	30	200	39,280
12	104	40	50	200	89,800
13	108	20	50	200	24,890
14	108	60	50	200	44,080
15	112	40	50	200	77,510
Autoclave	121	20	10	200	9,205
T₀	-	-	10	200	9,025

Grafico 3 – Viscosità dei campioni a diverse concentrazioni



Successivamente si è proceduto ad analizzare se il fluido considerato possiede le caratteristiche di un fluido newtoniano o pseudoplastico e se esso può variare a concentrazioni diverse. Si è deciso quindi di analizzare il campione 7 avente una concentrazione del 30% e il campione 15 avente una concentrazione del 50% impostando una progressione di velocità partendo da 150 *rpm* fino a 220 *rpm*, calcolando per ciascuna misurazione della viscosità la velocità di flusso ($\frac{dv}{dy}$).

Per il campione 7 le misurazioni effettuate hanno mostrato come all'aumentare del $\frac{dv}{dy}$ anche la viscosità aumenta andando a rappresentare la situazione di un fluido newtoniano (tabella 7). Invece per il campione 15 si è dimostrato come all'aumentare del $\frac{dv}{dy}$, la viscosità diminuisce rappresentando la situazione di un fluido pseudoplastico (tabella 8).

Tabella 7 - Valori di viscosità a diverse velocità nel campione 7

Camp. N°7	rpm	Viscosità (mPa. s)	dv/dy	τ
1	150	7,836	16	125,376
2	160	7,946	17,06667	135,6117
3	170	8,186	18,13333	148,4395
4	180	8,467	19,2	162,5664
5	190	8,776	20,26667	177,8603
6	200	8,995	21,33333	191,8933
7	210	9,061	22,4	202,9664
8	220	9,126	23,46667	214,1568

Tabella 8 - Valori di viscosità a diverse velocità nel campione 15

Camp. N°15	rpm	Viscosità (mPa. s)	dv/dy	τ
1	150	84,360	16	1349,76
2	160	81,710	17,06667	1394,517
3	170	78,870	18,13333	1430,176
4	180	76,340	19,2	1465,728
5	190	74,190	20,26667	1503,584
6	200	72,560	21,33333	1547,947
7	210	70,880	22,4	1587,712
8	220	68,790	23,46667	1614,272

Oltre al calcolo della velocità di flusso, si è proceduto a calcolare anche lo sforzo tangenziale (τ), sia del campione 7 che quello del campione 15, confermando quanto descritto precedentemente sulla variazione del comportamento del fluido ad una concentrazione pari al 30% e al 50% (grafico 4 e 5).

Grafico 4 – Comportamento reologico del fluido nel campione 7

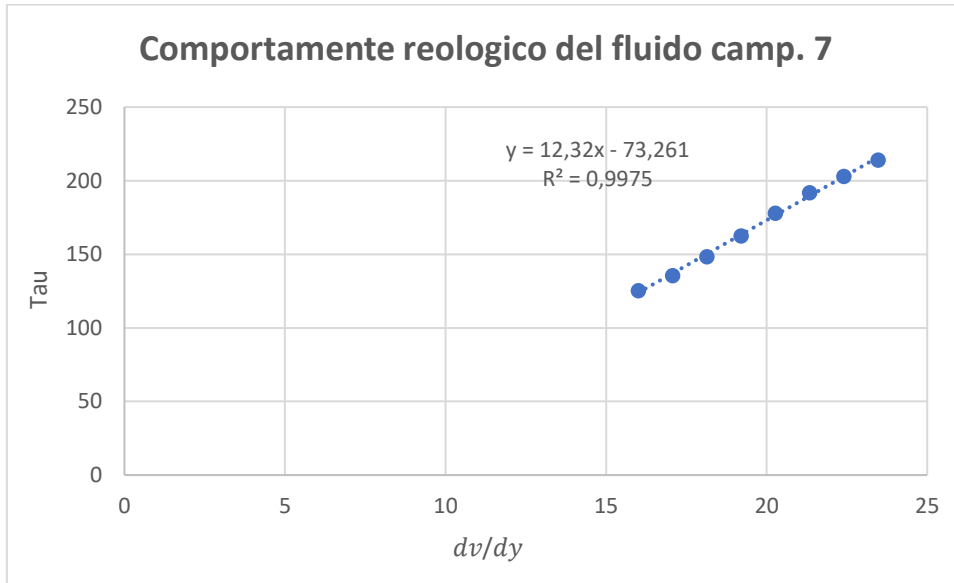
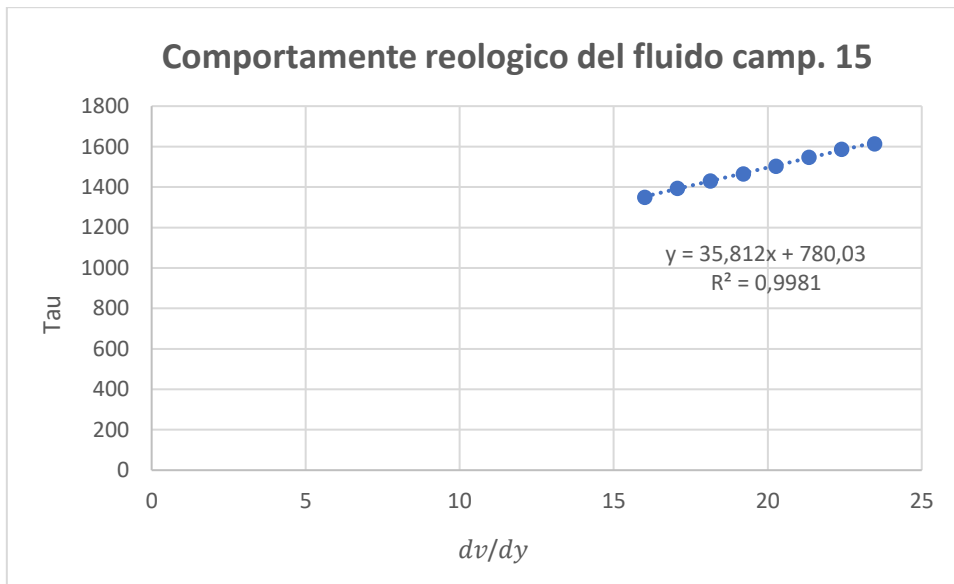


Grafico 5 - Comportamento reologico del fluido nel campione 15



4.3 Densità

Dalle analisi effettuate sui 17 campioni (considerando anche l'autoclave e il T₀), per determinare la variazione di densità che si presenta a diverse concentrazioni di particelle solide e temperatura, si sono ottenuti dei valori che si diversificano nell'ordine di un centesimo. Per cui, dai valori ottenuti da tale misura per i successivi ragionamenti per la realizzazione di un impianto è stato scelto di utilizzare un valore medio pari a $1,02 \frac{Kg}{L}$ e con una deviazione standard di 0,01 (tabella 9).

Tabella 9 – Valori di densità dei campioni

N. Campioni	Temp. (C°)	Tempo (min)	Conc. %	Vol. (L)	Mas. (Kg)	Densità ($\frac{Kg}{L}$)
1	104	40	10	0,10	0,1023	1,02
2	108	20	10	0,10	0,1025	1,03
3	108	60	10	0,10	0,1027	1,03
4	112	40	10	0,10	0,1028	1,03
5	104	20	30	0,10	0,1031	1,03
6	104	60	30	0,10	0,1030	1,03
7	108	40	30	0,10	0,1027	1,03
8	108	40	30	0,10	0,1025	1,03
9	108	40	30	0,10	0,1022	1,02
10	112	20	30	0,10	0,1028	1,03
11	112	60	30	0,10	0,1031	1,03
12	104	40	50	0,10	0,1010	1,01
13	108	20	50	0,10	0,1018	1,02
14	108	60	50	0,10	0,1029	1,03
15	112	40	50	0,10	0,1023	1,02
Autoclave	121	20	10	0,10	0,1024	1,02
T₀	-	-	10	0,10	0,1022	1,02

4.4 Calore specifico

Il calore specifico è stato calcolato anche in questo caso per verificare se sono presenti delle differenze significative tra i 17 campioni (compreso Autoclave e T₀). Dai dati ottenuti si è potuto constatare che, come per la proprietà fisica della densità, non ci sono variazioni troppe significative tra i campioni analizzati e anzi, a diversa temperatura di cottura, le misurazioni effettuate hanno dimostrato come esse non seguono tendenzialmente una linearità ben precisa come invece ci si poteva aspettare in una maniera più marcata (tabella 10). Per cui anche in questo caso per i successivi ragionamenti per la realizzazione di un impianto è stato considerato un valore medio pari a $4306,67 \frac{J}{K * Kg}$ con una deviazione standard di 211,03.

Tabella 10 – Valori di calore specifico dei campioni

N. Campioni	Massa Ogg. (g)	Temp. Ogg. (C°)	Massa Liquido (C°)	Temp. Liquido (C°)	Calore specifico (J/K * kg)
1	310,00	11,20	308,60	6,20	4619,18
2	309,10	13,00	305,00	7,60	4145,36
3	310,00	13,20	313,10	7,80	4031,46
4	303,00	13,00	306,30	8,10	4459,19
5	308,90	13,90	300,00	8,70	4284,24
6	285,30	13,40	307,70	8,20	3902,66
7	285,30	12,60	314,90	8,10	4487,49
8	285,30	13,20	301,20	8,10	4083,71
9	307,20	14,90	299,10	9,90	4341,31
10	303,00	13,60	307,50	8,90	4567,65
11	311,40	12,80	309,50	7,60	4293,19
12	285,40	12,40	302,10	7,60	4406,57
13	311,50	13,40	303,10	8,40	4498,75
14	311,50	12,10	301,40	6,80	4395,30
15	303,10	13,20	307,90	7,90	4083,93
Autoclave	310,00	14,90	300,20	9,60	4117,76
T ₀	311,50	14,10	314,80	8,90	4098,09

Il calore specifico oggetto e temperatura oggetto con rispettivamente valore di 502 g e 57 °C, non sono stati riportati in tabella 10 poiché possiedono un valore costante ma per il calcolo del calore specifico sono stati utilizzati ugualmente.

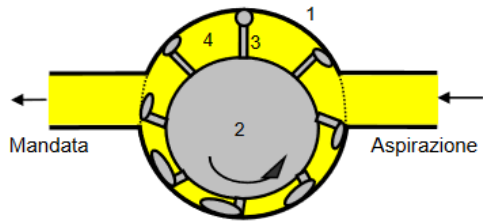
4.5 Considerazioni preliminari allo scale-up di un impianto

Queste misure avevano l'obiettivo di trasferire il procedimento effettuato in laboratorio (paragrafo 3.1 preparazione dei campioni) su scala industriale. Per effettuare questo, dagli strumenti di laboratorio bisogna passare ai macchinari industriali con lo scopo di ottenere valori di estrazione delle proteine molto simili rispetto a quelli conseguiti in laboratorio (schema 3). In questo studio per, effettuare tale processo, sono stati analizzati tutti i campioni misurando le proprietà fisiche considerate e, se presenti, le loro variazioni, con l'obiettivo di estrarre il maggiore quantitativo possibile di proteine contenute nel fluido di riferimento. Le proprietà fisiche considerate ai fini pratici sono state: la viscosità, la densità ed il calore specifico.

Dai dati analizzati precedentemente si è potuto constatare che il quantitativo maggiore di proteine estraibili dalla borlanda può essere estratte mediante l'impiego di una temperatura pari a 110°C con un tempo di cottura di 30 minuti ed utilizzando una concentrazione di particelle solide pari al 20%. Il primo passo per la realizzazione di un impianto è definire le proprietà fisiche in queste condizioni di temperatura, tempo e concentrazione.

Dall'analisi della viscosità si è potuto stabilire che il solo parametro che consente di aumentarne il valore, all'aumentare della concentrazione, è la percentuale di particelle solide. Attraverso quindi l'estrazione delle proteine aventi una concentrazione pari al 20% di particelle solide, si è potuto verificare che il comportamento reologico del fluido è di tipo newtoniano. Dall'analisi effettuata si è definito quindi la tipologia di pompa migliore da utilizzare per il trasporto del fluido. In questo caso la scelta è ricaduta sulle pompe volumetriche rotative con

rotore flessibile. Il loro funzionamento consiste nello spostamento del fluido tramite un moto rotatorio. Esse sono costituite da uno statore entro il quale opera il rotore. La configurazione geometrica dei due e la relativa rotazione concretizzano dei volumi riempiti di fluido che vengono spostati dall'aspirazione alla mandata, in modo abbastanza regolare, senza la necessità di valvole e spesso anche senza l'uso di accumulatori; inoltre è reversibile attraverso l'inversione del senso di rotazione, con la mandata che diventa aspirazione e viceversa. La sua portata è proporzionale al numero di giri al minuto dell'albero del rotore, al volume e al numero di camere che spostano volume verso la mandata. In particolare, questa pompa a palette con rotore flessibile (fig.7) ha caratteristiche di funzione molto simili alla pompa a palette con rotore eccentrico. Il rotore è costituito da un corpo unico con palette ed è rivestito il tutto da elastomero (neoprene) fissato ad un albero di collegamento con il motoriduttore. Le palette così si piegano, man mano che il tamburo si avvicina allo statore nella parte inferiore. Tra i vantaggi sono presenti la costruzione semplice, il basso costo, la reversibilità, oltre al fatto di essere facili da ispezionare e da pulire. Tra gli svantaggi si ricorda di effettuare una sostituzione cadenzata del rotore, viste le sollecitazioni di fatica sul materiale per la flessione alterna delle palette e il non utilizzo della pompa a vuoto poiché danneggerebbe il rotore per mancata lubrificazione. Le portate massime per questa pompa sono inferiori a $100 \text{ m}^3/\text{h}$ con pressioni non superiori a 3 bar . La scelta nell'utilizzo di questa pompa è ricaduta anche considerando che il fluido in questione venga trasportato sempre a freddo; se il fluido dovesse essere trasportato a caldo bisognerebbe cambiare la tipologia di pompa utilizzata poiché la gomma influenzerebbe negativamente il prodotto.



- 1) statore;
- 2) tamburo rotore di elastomero (neoprene);
- 3) paletta flessibile di elastomero;
- 4) camera interpalare.

Fig. 7 - Funzionamento pompa a rotore

La separazione della parte liquida per estrarre la quantità di particelle solide necessarie per ottenere una concentrazione al 20% è ricaduta sulla scelta del separatore a dischi con asse verticale andando a discapito del decanter. La scelta nell'utilizzo del separatore verticale è stata effettuata soprattutto per la possibilità di scaricare la feccia in maniera discontinua, la possibilità di separare particelle relativamente piccole (ovvero con diametro da $0,5 \mu m$ fino a $1 mm$) e per la concentrazione di sostanza secca che in questo studio risulta essere inferiori al 10%. Il funzionamento del separatore a dischi verticale (fig.8) consiste, grazie alla forza centrifuga applicate alle particelle solide più pesanti, spinte radialmente verso l'esterno, di depositarsi sul lato interno di ciascun disco presente. Attraverso sempre l'utilizzo della forza centrifuga che si genera, le particelle scivolano uscendo per raccogliersi nella camera dei fanghi situata perifericamente. Tale camera anulare di forma biconica, è il risultato di due tamburi o boli, uno superiore e uno inferiore, entrambi conici e costituenti la superficie di chiusura del complesso rotante. Il complesso che si forma ruota generalmente ad un regime compreso tra 5000 e 7500 *giri/min*. La limitata distanza tra i dischi che non deve essere superiore ai $2 mm$ consente un regime laminare per il moto del fluido nello spazio interdiscale. Il regime turbolento è da evitare in quanto impedirebbe, con i vortici che si formano, la separazione delle particelle solide.

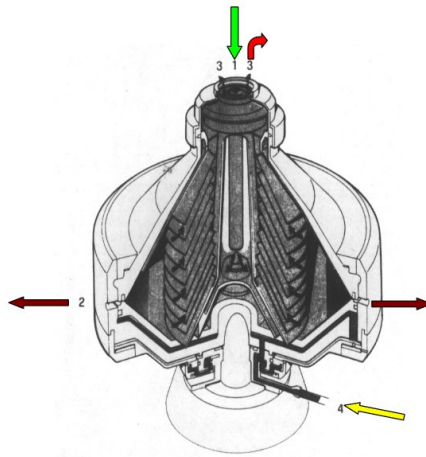


Fig. 8 – Funzionamento di un separatore a dischi verticale

Una volta estratte le particelle solide e addizionate alle borlande con l'obiettivo di raggiungere una concentrazione pari al 20%, esse mediante sempre l'utilizzo di pompe volumetriche rotative con rotore flessibile sono trasferite all'interno di un cuocitore. I valori di temperatura e di tempo di cottura con cui il macchinario deve essere impostato per ottenere la quantità desiderata di proteine estraibili sono rispettivamente pari a 110°C per un tempo di 30 minuti. Per ottenere una temperatura di 110°C , la pressione raggiunta deve essere di $1,432\text{ bar}$ e considerando il valore da utilizzare superiore a $0,5\text{ bar}$, il cuocitore rientra nella direttiva attrezzature a pressione (PED, *Pressure Equipment Directive*) nella tipologia recipienti come per l'autoclave. L'attrezzatura in pressione che ricade in questa direttiva deve soddisfare i requisiti essenziali enunciati nell'Allegato I della Direttiva e deve anche essere riportata la marcatura CE, seguita dal numero di notifica dell'Organismo Notificato. I principali elementi della normativa sono l'introduzione del concetto di Organismo notificato (assente nelle normative precedenti sul settore degli apparecchi a pressione) quale ente certificatore per le attività di costruzione delle apparecchiature a pressione. Inoltre, nella nomenclatura sono presenti delle indicazioni specifiche come "attrezzature a pressione" intendendo ogni parte soggetta a una pressione interna (tubazioni, apparecchi a pressione, etc.), "accessori a pressione" ed "accessori di sicurezza"

cioè mezzi volti a limitare la pressione in determinate circostanze. La PED identifica come responsabile unico del processo produttivo il fabbricante, coadiuvato per alcune attività dall'Organismo notificato. La norma contiene anche la previsione di una procedura dedicata per i fabbricanti che operano in sistema di gestione qualità. Infine, la PED impone ai fornitori di identificare il livello di pericolosità dell'apparecchiatura costruita mediante l'ausilio di una classificazione per livello di pericolosità.

Il calore può essere trasmesso per conduzione se la modalità di trasmissione termica avviene nei corpi solidi o per convezione forzata se la modalità di trasmissione termica avviene nei corpi liquidi e gassosi, ossia è lo stesso fluido che essendo in movimento trasporta anche il calore. In questo studio il calore viene trasmesso per convezione forzata ed il flusso termico che la caratterizza è esprimibile con l'equazione di Newton: $q = \alpha * A(T_f - T_s)$, dove T_f e T_s sono rispettivamente la temperatura del fluido e quella della superficie lambita, A è l'area lambita e α è il coefficiente di convezione. I parametri che influenzano il coefficiente α sono: velocità del fluido (v , m/s), geometria della sezione di passaggio del fluido rappresentabile con il diametro se a sezione circolare (D_{id} , mm), densità del fluido (ρ , Kg/m^3), viscosità del fluido (μ , $Pa * s$) conducibilità termica del fluido (λ_f , $W/(m * K)$) e il calore specifico (c , $J/Kg * K$). In questo studio sono stati presi in esame i valori di viscosità, densità e calore specifico calcolati e analizzati nei paragrafi precedenti mentre sono stati attribuiti a fini pratici una velocità di $2 m/s$ ed un diametro della sezione di $60 mm$; solo per la conducibilità non è stato possibile calcolarne il valore. Per la viscosità, come già precedentemente riportato, il valore utilizzato è pari al 20% di concentrazione che equivale ad un valore numerico intorno a $10 mPa.s$. Invece per la densità e il calore specifico si è scelto di utilizzare un valore medio tra tutti i campioni analizzati poiché non sono presenti delle variazioni così importanti da essere tenute in considerazione. Il valore medio attribuito alla densità e al calore

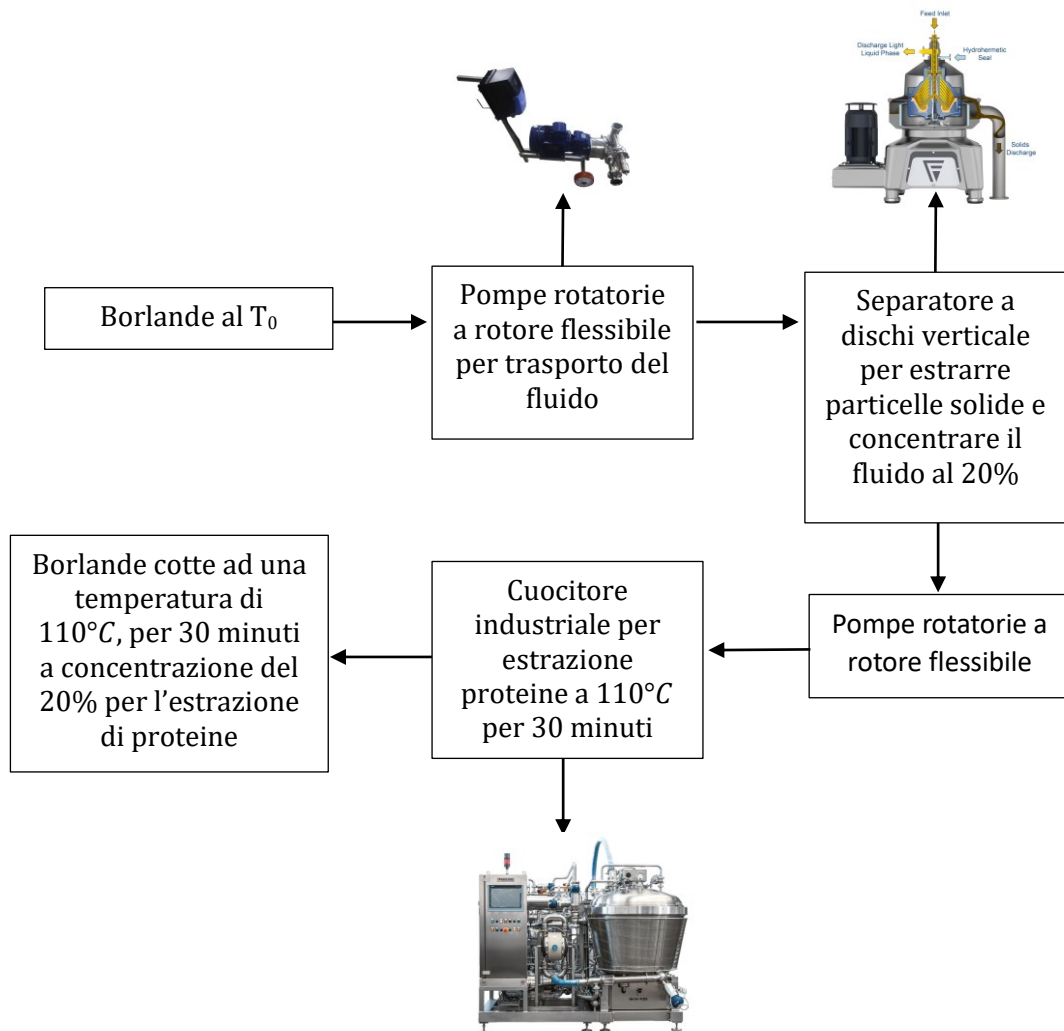
specifico è rispettivamente di $1,02 \frac{Kg}{L}$ e di $4306,67 \frac{J}{K*Kg}$. Nel fenomeno fisico della convezione forzata, le 7 variabili, cioè le 6 indipendenti più quella dipendente α , possono essere accorpate in 3 numeri adimensionali:

- N. di Reynolds: $Re = \frac{\rho*v*D_{id}}{\mu}$;
- N. di Nusselt: $Nu = \frac{\alpha*D_{id}}{\lambda_f}$;
- N. di Prandtl: $Pr = \frac{c*\mu}{\lambda_f}$.

In questa maniera si può ricavare Nu mettendo in funzione Re e Pr : $Nu = F(Re, Pr)$. Nu appare come variabile dipendente poiché contiene l'incognita cercata α . Le espressioni ottenute sperimentalmente per la funzione descritta precedentemente sono diverse a seconda se il fluido sia newtoniano o pseudoplastico e se il fluido sia laminare o turbolento. Per il calcolo del coefficiente di convezione del fluido alimentare, considerando il cuocitore come macchinario per trasmettere il calore, si utilizza la formula $Nu = 4,9 * Re^{0,57} * Pr^{0,47} * \left(\frac{D_i*N}{v}\right)^{0,17} * \left(\frac{D_i}{L}\right)^{0,37}$. Da questa si può ricavare α tramite l'utilizzo della formula $\alpha_{fa} = \frac{Nu_{fa} * \lambda_{fa}}{d_i}$. Attraverso questo procedimento è possibile calcolare il flusso termico che è definito come l'energia termica scambiata nell'intervallo in un tempo stabilito. Tra i cuocitori industriali sono molte le tipologie esistenti, tutte con caratteristiche diverse in base all'obiettivo che si vuole raggiungere: brasiera con mescolatore e ribaltamento automatico, brasiera a vapore con chiusura a pressione, pentole con mescolatore e ribaltamento automatico. In particolare, la tipologia analizzata in questo studio permette di mantenere la pressione grazie al coperchio, con conseguente riduzione dei consumi energetici. La struttura è costruita in acciaio inox e tra gli accessori a disposizione sono presenti: un mescolatore che garantisce una rotazione in entrambi i sensi a velocità regolabile, valvole di scarico e sonde per gestire la temperatura in modo ottimale.

Schema 3 – Scale-up preliminare di un impianto

Scale-up preliminare di un impianto



5. CONCLUSIONI

In questo studio è stato preso in esame la valutazione preliminare di uno scale-up per la realizzazione di un eventuale impianto per la valorizzazione delle proteine estratte, ottenute da un sottoprodotto proveniente dal processo di distillazione (borlanda). La valorizzazione dei sottoprodotti negli ultimi anni sta diventando sempre più oggetto di ricerca da parte delle aziende per cercare di diminuire la grande quantità di sprechi e i costi di smaltimento, sia delle fecce ottenute da processi di vinificazione che delle borlande ottenute dai processi di distillazione.

Da come è stato possibile osservare attraverso la creazione di un disegno sperimentale (fig.6), dai 17 campioni preparati in laboratorio, i valori maggiori di proteine estraibili si hanno ad una temperatura di $110^{\circ}C$, con un tempo di cottura di 30 minuti ed a una concentrazione di particelle solide del 20%. Da questi dati ottenuti attraverso la misurazione delle proprietà fisiche quali viscosità, densità e calore specifico è stato possibile analizzare il loro tipo di comportamento e come essi variavano ad una diversa temperatura, tempo di cottura e concentrazione. Per quanto riguarda la viscosità si è potuto constatare come sia solo la concentrazione di particelle solide ne permette di variare. Infatti, ad una concentrazione del 30% il tipo di fluido analizzato si comporta come un fluido newtoniano, invece ad una concentrazione del 50% si comporta come un fluido pseudoplastico (tabella 7 e 8). Il valore attribuito alla viscosità avente una concentrazione del 20% è intorno a $10\text{ mPa}\cdot\text{s}$. Non è inoltre stato possibile determinare con precisione a che entità di concentrazione avviene questa variazione ma dall'analisi effettuata si può constatare con sicurezza che tra il 30% e il 50% è presente una variazione della reologia del fluido che passa da newtoniano a pseudoplastico. Per quanto riguarda la densità e il calore specifico, lo studio condotto ha permesso di stabilire come queste due proprietà fisiche, ad una diversa temperatura, tempo di cottura e concentrazione dei 17 campioni,

tendenzialmente non variano ottenendo dei valori molto simili tra loro. Per questo motivo per entrambe le misure sono stati attribuiti un valore medio pari a $1,02 \frac{Kg}{L}$ per la densità e di $4306,67 \frac{J}{K*Kg}$ per il calore specifico (tabella 9 e 10). Per la realizzazione dell'impianto, dai dati ottenuti si sono potuti determinare quali strumenti migliori utilizzare. La scelta della pompa per il trasporto del fluido è ricaduta nelle pompe rotative con rotore flessibile per il suo basso costo di acquisto, manutenzione, facilità di pulizia e per il non bisogno di pressione alte. Per l'estrazione delle particelle solide per ottenere una concentrazione al 20% è stato scelto di utilizzare il separatore a dischi verticale poiché rispetto al decanter permette di scaricare in maniera discontinua, di separare particelle con diametro tra i $0,5 \mu m$ fino a $1 mm$, oltre ad avere una maggiore compattezza. La scelta sul macchinario da utilizzare per l'ultima fase di cottura della sostanza per l'estrazione delle proteine è ricaduta in un cuocitore industriale, impostandolo ad una temperatura di $110^{\circ}C$ e per un tempo di cottura di 30 minuti. Per ottenere il valore di temperatura desiderato il cuocitore deve raggiungere un valore di $1,432 bar$ rientrando così nella direttiva dei recipienti in pressione (PED). Attraverso il valore del coefficiente α calcolato per mezzo delle 6 variabili, che sono: velocità, diametro della sezione, densità e viscosità del fluido, calore specifico e conducibilità termica (non è stata calcolato in questo studio per motivi pratici) è possibile determinare il flusso termico che caratterizza la convezione forzata, cioè quella quantità di calore che si propaga nell'unità di tempo. Questo studio, pertanto, ha permesso di sviluppare un'analisi preliminare per il dimensionamento di un impianto di tipo industriale volto ad affrontare e risolvere l'importante tematica dello smaltimento del sottoprodotto formatosi a seguito del processo di distillazione.

Sitografia e Bibliografia

De Iseppi A., Lomolino G., Marangon M., Curioni A. (2020); **Current and future strategies for wine yeast lees valorization.** Food Research International journal homepage, 137, 109352.

De Iseppi A., Curioni A., Marangon M., Invincibile D., Slaghenaufi D., and Ugliano M (2023). **Chemical and Electrochemical Assessment of Wine Lees Extracts Tested as Novel Antioxidant Additives in Model Wine.** Agricultural and food chemistry.

De Iseppi A., Curioni A., Marangon M., Vincenzi S., Kantureevac G., and Lomolino G (2019). **Characterization and emulsifying properties of extracts obtained by physical and enzymatic methods from an oenological yeast strain.** Wiley Online Library.

De Iseppi A., Marangon M., Vincenzi S., Lomolino G., Curioni A., Divol B (2021). **A novel approach for the valorization of wine lees as a source of compounds able to modify wine properties.** LWT - Food Science and Technology, 136, 110274.

De Iseppi A., Marangon., Lomolino., Crapisi., Curioni A (2021). **Red and white wine lees as a novel source of emulsifiers and foaming agents.** LWT - Food Science and Technology, 152, 112273.

Nuove tecniche per la valorizzazione della vinaccia e della feccia di distillazione:
https://www.assenologi.it/wp-content/uploads/2019/02/valorizzazione_vinaccia_feccia_aprile2015.pdf

Tesi di laurea del laureando Alessio Zanardo: **Studio degli effetti di procedure diverse, prima e dopo distillazione, sul profilo aromatico della vinaccia e del distillato prosecco:**
https://www.confraternitavitevino.it/Archivio/Biblioteca/Tesi/TB11_2095_A_Zanardo.pdf

Magdalena, Katarzyna Z., Bułkowska and Mikucka W. **Valorization of Distillery Stillage for Bioenergy Production;**
<https://www.mdpi.com/1996-1073/14/21/7235>

Handbook of grape processing by-products sustainable solutions; Edit by Charis M. Galanakis

Ingegneria dell'industria agroalimentare volume 1; di Dario Friso

Vino: <https://it.wikipedia.org/wiki/Vino>

Storia del vino: https://it.wikipedia.org/wiki/Storia_del_vino

Origini del vino: <https://www.cantinegulino.it/le-origini-del-vino-in-italia/>

Pigiatura e diraspatura:

<https://www.quattrocalici.it/conoscere-il-vino/pigiatura-e-diraspatura/>

Vinificazione: <https://it.wikipedia.org/wiki/Vinificazione>

Tipi di vinificazione:

<https://www.quattrocalici.it/conoscere-il-vino/typi-di-vinificazione/>

Fermentazione del vino:

<https://www.callmewine.com/blog/wine-academy/sommelier-tips/fermentazione-del-vino/>

Travasi del vino:

<https://www.ermacora.it/storie/quando-travasare-vino>

Trattamenti e correzioni al vino:

<https://www.vinoway.com/pedia/pedia-enologia/il-vino-trattamenti-e-correzioni/trattamenti-e-correzioni-del-vino/>

Differenze tra vinificazione in bianco e in rosso:

<https://www.lacortedeiventi.it/it/blog/vinificazione-in-rosso-e-in-bianco-quali-sono-le-differenze-177>

“Guida ai composti bioattivi dai residui di lavorazione dell’uva”:

https://www.tecnoali.com/Prog%20area/Booklets/Booklet%20GRAPE_italian_4.pdf

Le vinacce:

<https://www.ravazzi.it/!wineblog/vinaccecosa-sono-e-come-si-usano-1384>

Mannoproteine stato dell’arte: struttura molecolare ed effetti enologici:

https://www.assoenologi.it/wpcontent/uploads/2019/09/assogiovani_settembre2019.pdf

Distilleria Castagner: <https://www.grappacastagner.it/>

BCA Protein Assay Kit:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225>

Cromatografia liquida ad alta prestazione:

https://it.wikipedia.org/wiki/Cromatografia_liquida_ad_alta_prestazione

Calore specifico:

<https://www.robertobigoni.it/Fisica/Studenti/Bernardoni/home.htm>

PED: https://it.wikipedia.org/wiki/Direttiva_apparecchi_a_pressione