



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento del Territorio e Sistemi Agroforestali
Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e
Ambiente

Corso di laurea in Scienze e tecnologie viticole ed
enologiche

Possibili semplificazioni dei metodi di analisi dei
materiali lignocellulosici nella loro applicazione ai
tralci di potatura.

Relatore
Prof. Marco Bravi

Laureando
Paolo Nizzi
Matricola n.
1221319

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Indice

Introduzione	5
Introduction.....	7
1 La matrice lignocellulosica.....	9
1.1 Materie prime vegetali.....	9
1.1.1 Materie prime legnose	10
1.1.2 Materie prime erbacee	10
1.2 Matrici lignocellulosiche della filiera vitivinicola	10
2 Etanolo lignocellulosico	11
2.1 Processo produttivo	11
2.1.1 Pretrattamento	11
2.1.2 Idrolisi.....	12
2.1.3 Fermentazione	13
2.1.4 Separazione	13
3. Analisi della biomassa lignocellulosica.....	15
3.1. Evoluzione dei metodi di analisi nell'ultimo secolo.	15
3.1.1 Primi metodi di isolamento della lignina tramite acido solforico (1920-1935).	15
3.1.2 Quantificazione degli zuccheri nel legno e applicazione alle materie erbacee (1930-1960).	16
3.1.2 Prime applicazioni alimentari e adattamento dei metodi di analisi al legno (1960-1991)	16
3.1.3 Prime applicazioni per la produzione di biocombustibili (1990-2000).	17
3.2 Metodologia attuale	18
3.2.1 LAPs	18
3.2.2 LAP "Chiusura della somma del bilancio di massa sommativa"	18
3.2.3 LAP "Preparazione dei campioni per l'analisi compositiva"	18
3.2.4 LAP "Determinazione dei solidi totali nelle biomasse e totale solidi disciolti in campioni di processo liquidi"	18
3.2.5 LAP "Determinazione degli estrattivi in biomassa"	19
3.2.6 LAP "Determinazione delle ceneri nella biomassa"	20
3.2.7 LAP "Determinazione del contenuto proteico nella biomassa"	20
3.2.8 LAP "Determinazione dei carboidrati strutturali e della lignina nella biomassa"	20
3.3 Metodo standard NREL	24
3.3.1 Scopo dell'analisi e procedura	24
3.3.2 Preparazione del campione	24
3.3.3 Analisi per la lignina insolubile in acido	25

3.3.4	Analisi per la lignina solubile in acido.....	26
3.3.5	Analisi per i carboidrati strutturali	27
3.3.5	Analisi per il contenuto di acetile	28
3.3.6	Possibili interferenze a una corretta analisi	29
3.3.7	Aree di possibile miglioramento nell'analisi della biomassa.....	30
4	Semplificazioni possibili.....	32
4.1.	Semplificazione del metodo NREL.....	32
4.1.1.	Eliminazione parziale o totale della fase di determinazione degli estrattivi.....	32
4.1.2.	Idrolisi dei carboidrati strutturali a temperature inferiori ai 100°C e pressione atmosferica.....	32
4.2.	Metodi approssimati	34
4.2.1.	Analisi degli zuccheri totali	34
4.2.2.	Analisi delle specie fenoliche	34
	Appendice A.....	36
	Bibliografia.....	38

Introduzione

La produzione di etanolo da fonti rinnovabili e non in competizione con le filiere agroalimentari è un requisito normativo che ha portato tutti i principali produttori ad attrezzarsi così da soddisfare le esigenze del mercato facendo ricorso alla bio-raffinazione dei materiali lignocellulosici. Quest'ultima viene praticata dalla II guerra mondiale, ma alcuni ostacoli, tra cui la complessità dei materiali lignocellulosici, rendono ancora insoddisfacenti, sia per il dispendio energetico sia per la resa, le tecnologie attuali.

Nello scorso decennio la ricerca si è impegnata nello sviluppo di nuove modalità di bio-frazionamento della lignocellulosa in cellulosa, emicellulose e lignina più ecocompatibili. Grazie ai nuovi solventi, tra cui solventi invertibili e solventi eutettici, sembrano esservi delle possibilità di effettuare il frazionamento in modo meno energivoro ed altrettanto (o più) performante rispetto alle modalità consolidate. La sperimentazione, ad oggi, si rifà a protocolli di analisi complessi e di lunga esecuzione.

Per esplorare in pieno le possibilità delle tecnologie innovative date dai nuovi solventi, che richiedono un grande lavoro sperimentale di ottimizzazione, si richiede di svolgere molta sperimentazione e di disporre di protocolli che consentano di avere dei risultati esplorativi mediante poche fasi, condizioni di esecuzione il più possibile moderate, temperature le più basse possibili, apparecchiature semplici, e tempi rapidi, con campioni di piccola o piccolissima consistenza.

Il settore vitivinicolo è un esempio di virtuosità dal campo alla cantina e offre una materia prima lignocellulosica con flussi relativamente garantiti e senza competizione con la filiera alimentare: i tralci di potatura invernale.

Questa tesi ha l'obiettivo di esaminare i protocolli di analisi dei materiali lignocellulosici che permettono di conoscere la costituzione quantitativa nelle tre frazioni principali e di esplorare le possibilità di semplificazione che agevolano un piccolo laboratorio di svolgere una ricerca efficace sulle potenzialità di bio-frazionamento dei tralci di potatura con il ricorso ai nuovi solventi poc'anzi menzionati.

L'analisi della costituzione dei materiali lignocellulosici finalizzata alla produzione di carburanti ed altri materiali fa riferimento al protocollo sviluppato ed elaborato in più versioni successive dal National Renewable Energy Laboratory (NREL) del Department of Energy (DOE) degli Stati Uniti. Esso tiene conto del fatto che i materiali possano avere struttura erbacea o legnosa, e con questo presentare significative variazioni di composizione e struttura che il protocollo di analisi deve considerare in modo appropriato per evitare di incorrere in errori grossolani. In particolare, il protocollo richiede una preventiva stima degli estrattivi, componenti non strutturali che possono essere estratti da solventi (come grassi, cere, proteine, terpeni, gomme, resine, zuccheri semplici, amidi, fenolici, oli essenziali, pectine, mucillagini, glicosidi e saponine, acidi grassi, steroli e flavonoidi), una fase di idrolisi completa dei carboidrati strutturali ed una fase di analisi della lignina (solubile ed insolubile in acido).

Dall'esame di tale protocollo e della letteratura si propone una versione semplificata dello stesso, consolidato per crearne uno idoneo a misurare le prestazioni di bio-frazionamento svolte in piccolissima scala su tralci di potatura. Questo protocollo dovrà essere avvalorato sperimentalmente, un aspetto che non è contemplato in questa tesi.

Introduction

The production of ethanol from renewable sources, not in competition with the agri-food supply chains is a regulatory requirement that has led all the main producers to meet the market needs by resorting to the bio-refining of lignocellulosic materials. The latter has been practiced since World War II, but some obstacles, including the complexity of the lignocellulosic materials, still make current technologies unsatisfactory, both for energy expenditure and for yield.

Over the past decade, research has been engaged in the development of new ways of bio-fractionation of lignocellulose into more environmental-friendly cellulose, hemicellulose and lignin. Thanks to the new solvents, including invertible solvents and eutectic solvents, it seems to be the possibility to carry out fractionation in a less energy-intensive and equally (or more) efficient way compared to the established methods. The experimentation, to date, refers to complex and long-running analysis protocols.

To fully explore the possibilities of the innovative technologies given by the new solvents, which require a great deal of experimental work of optimization, it is required to carry out a lot of experimentation and to have protocols that allow to have exploratory results through a few phases, conditions of execution as moderate as possible, temperatures as low as possible, simple equipment and rapid times, with samples of small or very small consistency.

The wine sector is an example of virtuosity from the field to the cellar and offers a lignocellulosic raw material with relatively guaranteed flows and without competition with the food chain: winter pruning shoots.

This thesis aims to examine the analysis protocols of lignocellulosic materials that allow to know the quantitative constitution in the three main fractions and to explore the possibilities of simplification that facilitate a small laboratory to carry out effective research on the potential for bio-fractionation of the shoots. of pruning with the use of the new solvents mentioned above.

The analysis of the constitution of lignocellulosic materials aimed at the production of fuels and other materials refers to the protocol developed and elaborated in several

successive versions by the National Renewable Energy Laboratory (NREL) of the US Department of Energy (DOE). It takes into account the fact that the materials may have a herbaceous or woody structure, and that they can present significant variations in composition and structure that the analysis protocol must consider appropriately to avoid incurring gross errors. In particular, the protocol requires a prior estimate of the extractives, non-structural components that can be extracted from solvents (such as fats, waxes, proteins, terpenes, gums, resins, simple sugars, starches, phenolics, essential oils, pectins, mucilages, glycosides and saponins, fatty acids, sterols and flavonoids), a phase of complete hydrolysis of structural carbohydrates and a phase of lignin analysis (soluble and insoluble in acid).

From the examination of this protocol and the literature, a simplified version of the same is proposed to create a suitable method to measuring the performance of bio-fractionation carried out on a very small scale on pruning shoots. This protocol will have to be experimentally validated, an aspect that is not contemplated in this thesis.

1 La matrice lignocellulosica

Le biomasse lignocellulosiche sono a livello globale le più utilizzate per la produzione di bioenergia. La frazione organica che costituisce la biomassa possiede una complessa struttura molecolare, caratterizzata da legami stabili e complessi che rendono inaccessibili ai microrganismi le componenti più facilmente trasformabili.

La matrice lignocellulosica è composta da tre polimeri fondamentali: cellulosa, emicellulosa e lignina.

- La cellulosa è un polisaccaride costituito da catene non ramificate di glucosio unite da legami glicosidici. Le varie catene sono disposte parallelamente e legate tra loro tramite legami a idrogeno, formando una struttura cristallina idrofoba.
- L'emicellulosa è un polisaccaride complesso, a struttura ramificata, poco solubile e costituito da diversi tipi di zuccheri esosi, pentosi e acidi. E' amorfa, possiede proprietà adesive e dona alla matrice resistenza e rigidità. L'emicellulosa è inoltre il composto più facilmente estraibile tra le componenti lignocellulosiche.
- La lignina è un polimero aromatico organico complesso e pesante costituito essenzialmente da composti fenolici. Negli organismi vegetali lega tra loro le fibre ed esalta compattezza e resistenza della pianta. Da questo la necessità di disgregare la lignina per poter estrarre cellulosa ed emicellulosa dalla matrice.

1.1 Materie prime vegetali

La biomassa può derivare da piante arboree appositamente coltivate allo scopo di produrre energia o sfruttando gli scarti di lavorazione di varie filiere, identificati come biomasse residuali. Di particolare importanza risulta l'utilizzo di quest'ultime, in quanto, si rivalorizzano materiali di scarto che altrimenti rimarrebbero non sfruttati.

Le biomasse residuali possono provenire da attività agricole ed agro-industriali, segherie e industrie del legno, manutenzione del verde urbano. Le biomasse vegetali in generale invece si possono distinguere in legnose ed erbacee.

1.1.1 Materie prime legnose

Le materie prime legnose sono costituite principalmente dal legno di colture dedicate e scarti di potature e lavorazioni agricole. Queste tipologie di biomasse sono caratterizzate da valori relativamente alti di sostanza secca e soprattutto di lignina, componente che rende più difficoltoso l'accesso ai substrati fermentescibili.

Tra le specie appositamente coltivate troviamo pioppo, salice, paulownia, olmo, platano, eucalipto e ontano. I materiali residuali consistono in sarmenti, rami, frasche e cortecce di varie filiere, segatura e noccioli.

1.1.2 Materie prime erbacee

Le materie prime erbacee comprendono una variegata quantità di biomasse. In generale contengono un valore relativamente basso di lignina ma un elevato contenuto in acqua che potrebbe interferire con i processi di trasformazione e analisi se non correttamente gestito.

Tra le biomasse coltivate specificamente per la trasformazione in biocombustibile troviamo principalmente insilati (mais, sorgo, triticale). Le materie prime residuali comprendono principalmente paglia, bucce, foglie, fibre vegetali e materiali vegetali umidi in generale.

1.2 Matrici lignocellulosiche della filiera vitivinicola

Le matrici lignocellulosiche derivanti dalla filiera vitivinicola comprendono principalmente residui secchi legnosi, derivanti dalle potature e residui più o meno umidi derivanti dalla trasformazione in vino (vinacce). In particolare, tra queste biomasse residuali possiamo annoverare tralci di potatura, scarti di scacchiatura e spollonatura, vinacce e vinaccioli. Come evidenziato dai dati disponibili in appendice le biomasse più promettenti per la produzione di etanolo sono senza dubbio i tralci di vite, con elevato contenuto di polisaccaridi trasformabili e un altrettanto alto valore di alcol potenziale sviluppabile. Degne di nota sono anche le vinacce non fermentate, tra tutte le biomasse considerate le più ricche di zuccheri semplici già "pronti", appunto, per la fermentazione.

2 Etanolo lignocellulosico

Con il termine etanolo lignocellulosico ci si riferisce a un biocarburante originato dalla fermentazione degli zuccheri presenti nella biomassa vegetale vergine o di scarto.

In quanto proveniente direttamente dalle piante la combustione di bioetanolo non ha come controindicazione l'emissione netta di anidride carbonica nell'atmosfera. Questo aspetto lo rende particolarmente interessante come fonte energetica, nonché più sostenibile e meno inquinante di tutti gli altri combustibili fossili classici.

2.1 Processo produttivo

Il processo di produzione del bioetanolo consiste quindi nella fermentazione di zuccheri semplici derivanti da biomassa vegetale. Di fondamentale importanza sono il pretrattamento e l'idrolisi della matrice lignocellulosica in quanto essa non contiene zuccheri direttamente fermentescibili. In particolare, le due componenti dai quali si possono ottenere carboidrati monomeri sono la cellulosa e l'emicellulosa.

- La cellulosa è un polimero del glucosio a catena lineare con legami β -1,4.
- L'emicellulosa è un polimero ramificato composto da zuccheri a cinque e a sei atomi di carbonio. La sua natura amorfa la rende facilmente idrolizzabile.

A queste si può aggiungere l'amido, nel caso di alcune specie vegetali. Anch'esso polimero del glucosio con legami α -1,4 e α -1,6 ed anch'esso amorfo e quindi facilmente idrolizzabile.

2.1.1 Pretrattamento

Affinché la biomassa sia accessibile agli enzimi è necessario effettuare il pretrattamento della biomassa che ha lo scopo di indebolire la struttura cristallina della matrice e renderla microscopicamente penetrabile. I pretrattamenti possono essere divisi in tre tipologie: chimici, fisici e biologici.

Pretrattamenti chimici: trattamenti che utilizzano acidi forti (acido solforico, soda caustica) o solventi (etanolo, metanolo) al fine di rimuovere la lignina. Sono necessarie grandi quantità di solventi e il processo è altamente impattante a livello ambientale. In

questo campo è molto attivo lo studio di nuovi solventi più sostenibili e performanti, primi fra tutti i solventi eutettici NaDES (Natural deep eutectic solvents) e i liquidi ionici.

Pretrattamenti biologici: sfruttano microrganismi che delignificano la biomassa liberando e rendendo accessibile cellulosa ed emicellulosa. Si tratta di processi molto efficaci ma che richiedono lunghi tempi di permanenza della matrice nei bioreattori.

Pretrattamenti fisici: trattamenti che sfibrano macroscopicamente la matrice lignocellulosica. Se accoppiati con l'idrolisi risultano molto efficaci ma non selettivi. Anche per questi tipi di processi è attiva la ricerca di nuove tecnologie. A titolo di esempio si citano la Steam explosion (SE) e la Ammonia-Fiber Explosion (AFEX).

Particolarmente interessante risulta il processo di steam explosion che impiega esclusivamente vapor d'acqua saturo. Tramite compressione e decompressione si destruttura la matrice lignocellulosica rendendo i polimeri accessibili e solubilizzando l'emicellulosa, sotto forma di pentosani. La notevole velocità dell'SE rispetto ai pretrattamenti chimici permette inoltre di svolgere il processo in un reattore continuo.

2.1.2 Idrolisi

L'idrolisi della matrice lignocellulosica è necessaria per trasformare i polimeri in zuccheri semplici e fermentescibili, principalmente in glucosio. Il processo di idrolisi può essere distinto in chimico o enzimatico.

L'idrolisi chimica, effettuata utilizzando acidi forti, è relativamente economica e veloce ma possiede una bassa resa, produce molti sottoprodotti e necessita di una neutralizzazione a fine processo.

L'idrolisi enzimatica avviene ad opera di un pool di enzimi chiamati cellulasi. Le cellulasi si dividono in Cl e Cx a seconda della loro attività. In particolare, le cellulasi Cl degradano la struttura cristallina della cellulosa, dividendola in catene lineari. Le catene vengono degradate dalle cellulasi Cx con produzione di cellobiosio, che viene a sua volta convertito dalle β -glucosidasi in glucosio.

2.1.3 Fermentazione

Il processo di fermentazione è attuato da microrganismi che convertono gli zuccheri ottenuti in etanolo. Gli zuccheri a sei atomi di carbonio (come il glucosio) sono facilmente fermentescibili mentre gli zuccheri a cinque atomi di carbonio (come xilosio e arabinosio) fermentano più lentamente e solo grazie all'azione di microrganismi specifici.

“Da ogni molecola di glucosio, sono prodotte due molecole di etanolo e due di anidride carbonica. Dai corrispondenti pesi molecolari si calcola che il peso dell'etanolo prodotto, in condizioni di resa quantitativa, equivale al 51% del peso del glucosio impiegato.” (Zimbardi e Viola, 2001).

Al fine di ottimizzare la bioconversione i processi di idrolisi enzimatica e fermentazione possono essere condotti insieme contemporaneamente, migliorando l'efficienza della saccarificazione e utilizzando un solo reattore. Questo comporta altresì una serie di accorgimenti nella gestione della SSCF (Simultaneous saccharification and co-fermentation), in particolare:

- Gestione della temperatura: i due processi hanno due temperature ottimali di svolgimento diverse. Gli enzimi, infatti, svolgono al meglio la loro azione a 50-60°C mentre i lieviti lavorano in maniera ottimale mediamente intorno ai 20-30°C. Risulta evidente la necessità di trovare un compromesso che permetta al lievito di sopravvivere e svolgere la sua attività in maniera esaustiva e che non deprima eccessivamente l'attività enzimatica. Da alcune ricerche risulta che la temperatura ottimale allo scopo sia 35-37°C.
- Detossificazione: eliminazione delle sostanze che inibiscono il lievito (acidi carbossilici e fenoli). Il metodo di detossificazione più semplice è il lavaggio con acqua, in quanto la maggior parte degli inibenti risulta idrosolubile.

2.1.4 Separazione

La separazione dell'etanolo prodotto avviene principalmente per distillazione a basse temperature. Tra i metodi di separazione meno convenzionali possiamo citare: distillazione sottovuoto, reattori a membrana, gas-stripping, fermentazione estrattiva

con solventi atossici. L'efficienza della separazione è incoraggiata da un'alta concentrazione di etanolo nella soluzione.

Sempre al fine di ottimizzare il processo alcune metodologie prevedono l'unione delle tre fasi: idrolisi, fermentazione e separazione. Oltre alle problematiche già citate precedentemente, con l'aggiunta della separazione in contemporanea a una SSCF si rende necessaria la ricerca di un ulteriore compromesso in merito alla concentrazione di etanolo in fase operativa. Da una parte, infatti, l'alta concentrazione di etanolo favorisce un'efficiente separazione, dall'altra inibisce la fermentazione e la produzione dell'etanolo stesso da parte dei lieviti.

3. Analisi della biomassa lignocellulosica

3.1. Evoluzione dei metodi di analisi nell'ultimo secolo.

Dall'inizio del 1900 sono stati sviluppati metodi per l'analisi della composizione della biomassa che dopo quasi un secolo di revisioni e miglioramenti hanno portato alla costituzione dei protocolli attualmente in uso. Di seguito si ripercorre brevemente il progresso di tali metodi basati sull'utilizzo dell'acido solforico.

3.1.1 Primi metodi di isolamento della lignina tramite acido solforico (1920-1935).

Questo metodo prende il nome da Klason, accreditato come il primo ad aver usato l'acido solforico nel 1906 nel tentativo di determinare la struttura della lignina da legno di abete.

Il metodo prevede due idrolisi successive: la prima con acido solforico al 66% in peso per gelatinizzare il legno e una seconda a 0,5% in peso di acido cloridrico, previa filtrazione dei solidi. Successivamente è prevista un'estrazione in due fasi con solvente costituito da una miscela alcool/benzene. La prima idrolisi, della durata di 16 ore, a temperatura ambiente con concentrazione di 72% in peso, seguita poi da diluizione con acqua al 3% in peso per 2 ore.

Sherrard e Harris nel 1932 espongono una vasta gamma di metodi di isolamento della lignina con aggiunta di estrazioni con acqua calda e fredda per la preparazione del campione e testano diverse condizioni di idrolisi primaria. Le loro condizioni riducevano al minimo la degradazione dei carboidrati in prodotti insolubili.

Nel 1935 altri due ricercatori Ritter e Barbour suggeriscono di effettuare una terza estrazione alcolica al 95% in peso prima dell'estrazione alcool/benzene e acqua su alcuni tipi di legno per rimuovere i tannini del catecolo prima della determinazione della lignina.

3.1.2 Quantificazione degli zuccheri nel legno e applicazione alle materie erbacee (1930-1960).

Norman e Jenkins nel 1930 scoprono che alcuni carboidrati, proteine o sostanze azotate potrebbero coprecipitare con la lignina. Sulla base di questa scoperta nel 1945 Dunning e Lathrop descrivono un metodo di idrolisi basato su quello di Ritter e lo applicano ad un processo di saccarificazione acida su residui agricoli.

Nel 1933 Ritter e il suo team cercano di determinare le cause della variabilità delle rese zuccherine ottenute con i metodi precedenti. In particolare testano diverse durate temporali delle idrolisi primarie e diverse condizioni di temperatura su cellulosa di abete isolata trovando rese massime a 6 ore a 16°C o 2 ore a 35°C.

Nel 1945 Saman e i suoi collaboratori modificano i passaggi del metodo precedente per velocizzare il processo testando una prima idrolisi a 30°C per 45 minuti e una seconda effettuata in autoclave della durata di un'ora. Sempre nello stesso anno gli autori pubblicano un metodo di rilevamento cromatografico su carta degli zuccheri e introducono l'uso di fattori di perdita per correggerne la degradazione durante l'idrolisi.

Nel 1954 Harwood analizza erba e trifogli preidrolizzandoli in acido solforico 1 N (4,76% in peso) per rimuovere la maggior parte dei pentosani. Da questo momento in poi i metodi precedentemente descritti vengono applicati su diversi substrati.

3.1.2 Prime applicazioni alimentari e adattamento dei metodi di analisi al legno (1960-1991)

Sloneker sviluppa un nuovo metodo di rilevamento dello zucchero utilizzando la gas-cromatografia liquida (GC) per quantificare gli zuccheri idrolizzati secondo il metodo Saeman.

Nel 1983 Slavin e Marlett testano la HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilizzando una colonna di scambio cationico per zuccheri neutri in acido idrolizzato da fibre detergenti neutre estratte da alimenti e campioni fecali.

Nel 1991 Theander sviluppa il "metodo Uppsala" aggiungendo una fase di estrazione dei materiali lignocellulosici tramite etanolo all'80%vol prima dell'idrolisi con acido solforico.

Nello stesso anno Kaar e colleghi sviluppano "un metodo di analisi sommativa rapido e affidabile" per il legno eseguendo la fase dell'autoclave in bombe sigillate al fine di mantenere l'acido acetico volatile e la 2-furaldeide, e analizzando gli idrolizzati mediante HPLC. In questo modo è stato possibile misurare idrossimetilfurfurolo (HMF), furfurolo, acido acetico, acido levulinico e acidi uronici negli idrolizzati e aggiungere poi queste quantità nei componenti glucano e xilano, invece di misurare i fattori di perdita degli zuccheri.

3.1.3 Prime applicazioni per la produzione di biocombustibili (1990-2000).

Dagli anni novanta in poi i ricercatori di NREL applicano le metodologie precedenti alla ricerca sui biocarburanti, giungendo alla conclusione che i residui solidi ottenuti con il pretrattamento e la fermentazione devono essere separati in frazioni solide e liquide per un'analisi efficace.

Attualmente le analisi effettuate da NREL si basano su adattamenti dei processi di idrolisi di Saeman, del metodo di estrazione dell'etanolo Uppsala e il metodo HPLC descritti da Kaar e colleghi. Le modifiche a questi metodi hanno portato alla creazione di protocolli analitici che possono essere applicati non solo a semplici materie legnose ma anche a materiali più complessi come residui agricoli ed erbacei.

Il calcolo dei coefficienti di estinzione specifici della materia prima e delle lunghezze d'onda corrispondenti ha ridotto al minimo l'interferenza dei prodotti di degradazione dello zucchero. Sono stati studiati anche i profili amminoacidici della materia prima grezza, insieme all'azoto totale prima e dopo l'estrazione con acqua/etanolo, per determinare il contributo delle proteine strutturali alla composizione della materia prima erbacea.

L'HPLC è la tecnologia utilizzata per rilevare i carboidrati negli idrolizzati della biomassa. Questo metodo ha come vantaggio una preparazione del campione relativamente semplice e un altrettanto semplice separazione isocratica con acqua come fase mobile e con rivelatore ad indice di rifrazione (RID).

3.2 Metodologia attuale

3.2.1 LAPs

Per un'analisi completa della biomassa la NREL ha creato una suite di LAP (Laboratory Analytical Procedure) con lo scopo di costituire una misura rispondente alle esigenze della conversione biochimica fermentativa delle matrici lignocellulosiche. Per l'analisi di altri tipi di biomasse sono necessari relativi accorgimenti ai vari metodi utilizzati e l'eventuale uso di fogli di calcolo per ottenere le concentrazioni di composti normalmente non considerati dall'analisi tradizionale.

3.2.2 LAP “Chiusura della somma del bilancio di massa sommativa”

Il LAP fornisce una panoramica delle metodiche di analisi della biomassa, inclusa la metodologia alla base delle procedure, i punti critici nei processi analitici e un diagramma di flusso dettagliato delle analisi per aiutare l'operatore ad individuare tutti i costituenti appropriati in una materia prima.

3.2.3 LAP “Preparazione dei campioni per l'analisi compositiva”

Il LAP descrive la preparazione del campione per le successive analisi compositive, in particolare la sua essiccazione e la riduzione delle sue dimensioni. Tutte le procedure di analisi della composizione della biomassa presuppongono che i campioni siano stati preparati per soddisfare le specifiche richieste da ogni relativa analisi. In particolare, i campioni devono essere essiccati in condizioni moderate (con temperature inferiori ai 45°C) per preservare il materiale della biomassa e prevenire la degradazione microbica.

3.2.4 LAP “Determinazione dei solidi totali nelle biomasse e totale solidi disciolti in campioni di processo liquidi”

Il LAP descrive i metodi utilizzati per misurare i solidi totali presenti in un campione di biomassa solida o in sospensione e per determinare i solidi disciolti in un campione di liquido. A causa dell'elevata variabilità del contenuto di umidità nelle materie prime di biomassa, infatti, i risultati di tutte le analisi di composizione della biomassa stessa sono riportati sulla base del peso secco. Questo significa che il contributo ponderale dell'umidità è stato matematicamente rimosso.

3.2.5 LAP “Determinazione degli estrattivi in biomassa”

Il LAP ha l'obiettivo di determinare i materiali solubili non strutturali in un campione di materia prima di biomassa e la determinazione del saccarosio estraibile in acqua, se presente. A tal fine è previsto un processo di estrazione in due fasi per rimuovere il materiale solubile in acqua e quello solubile in etanolo. La procedura descrive due metodi alternativi per l'estrazione:

- L'estrazione Soxhlet: processo standard industriale per l'estrazione adatto per la maggior parte dei tipi di biomassa.
- L'estrazione tramite Dionex ASE: riduce notevolmente le tempistiche e il solvente necessari per ciascuna estrazione, ma non è adatta a tutti i tipi di biomassa. Inoltre, mentre un estrattore Soxhlet fa parte della dotazione “standard” di un laboratorio chimico, lo stesso non si può dire dell'estrattore Dionex menzionato.

L'estrazione con etanolo è necessaria per tutte le biomasse per garantire la rimozione dei materiali cerosi che coprecipitano durante la filtrazione dell'idrolizzato acido, rendendone difficile il filtraggio e portando, di conseguenza, ad una sovrastima del contenuto di lignina. Quando vengono analizzate materie prime legnose, la sola estrazione con etanolo è generalmente sufficiente per rimuovere il materiale estraibile interferente. Per materiali erbacei o tipi di biomassa con quantità apprezzabili di zuccheri liberi nel campione, è necessaria un'estrazione con acqua prima dell'estrazione con etanolo.

La frazione idrosolubile può includere materiale inorganico, materiale azotato e zuccheri non strutturali, che interferiscono con l'analisi dei carboidrati strutturali. Questi composti non strutturali sono di difficile quantificazione a causa del gran numero di singoli composti, ciascuno a una concentrazione relativamente piccola. Il saccarosio è l'eccezione e la sua rimozione e analisi preventiva consente una migliore quantificazione del glucano strutturale presente in una materia prima.

3.2.6 LAP “Determinazione delle ceneri nella biomassa”

Questo LAP si occupa della determinazione dei materiali inorganici presenti sia nei campioni di biomassa intera che estratta. Oltre a contribuire in modo significativo alla massa totale, la frazione inorganica può interferire con l'idrolisi acida.

Per quantificare sia le ceneri strutturali sia quelle estraibili, l'analisi viene eseguita sia sul tal quale, sia sull'estratto. L'analisi è svolta tramite incenerimento in forno a 575°C per determinare la quantità di materiale inorganico nella biomassa.

La cenere strutturale è costituita da composti inorganici legati alla struttura fisica della biomassa, mentre per la cenere estraibile si intende materiale inorganico non legato che può essere rimosso mediante lavaggio o estrazione.

3.2.7 LAP “Determinazione del contenuto proteico nella biomassa”

Il LAP riguarda il calcolo dei fattori di conversione da azoto a proteine. Il contenuto di azoto della biomassa viene generalmente misurato mediante combustione o tramite il metodo Kjeldahl.

La misurazione delle proteine nella biomassa viene effettuata indirettamente mediante la misurazione del contenuto di azoto e l'uso di un fattore di conversione azoto-proteina (fattore N). Inoltre, la proteina interferisce con le misurazioni della lignina nelle analisi successive mentre la sua quantificazione preventiva consente di minimizzare matematicamente questa interferenza. Poiché i composti contenenti azoto possono essere rimossi durante il processo di estrazione, l'analisi delle proteine viene eseguita sia sulle frazioni tal quali, sia sugli estratti.

3.2.8 LAP “Determinazione dei carboidrati strutturali e della lignina nella biomassa”

Il LAP descrive la quantificazione della lignina e l'analisi dei carboidrati, inclusa la preparazione degli standard, la neutralizzazione dell'idrolizzato, l'impostazione del metodo HPLC e l'analisi dell'acetile.

I carboidrati e la lignina giustificano la maggior parte della composizione della biomassa. La procedura di idrolisi analitica è di tipo acido e avviene in due fasi. La

prima si svolge in acido solforico al 72% ed è seguita da una seconda fase sempre con acido solforico (questa volta al 4%) in autoclave. Questa seconda fase deve essere svolta in recipienti sigillati e resistenti alla pressione per frazionare la biomassa in forme che sono più facilmente quantificabili.

La lignina si fraziona in materiali solubili e insolubili in acido, che vengono misurati separatamente. Il materiale insolubile in acido, misurato gravimetricamente, è considerato lignina ad alto peso molecolare, la lignina solubile in acido è a basso peso molecolare.

I carboidrati strutturali vengono idrolizzati in zuccheri monomerici, che sono solubili nella soluzione di idrolisi e facilmente quantificabili mediante HPLC. L'idrolisi degli zuccheri oligomerici in monomeri produce vari prodotti di degradazione e viene applicato un fattore di perdita per apportare correzioni appropriate.

Questa idrolisi ha diverse potenziali interferenze. È adatta solo per campioni che non contengono estratti, poiché gli estrattivi si possono ripartire in modo irriproducibile tra le frazioni solubili e insolubili, determinando un valore della concentrazione della lignina in eccesso o in difetto rispetto al vero (quantificazione gravimetrica). I campioni con contenuto di ceneri superiore al 10% in peso potrebbero non essere adatti a questa procedura, poiché potrebbero contenere minerali che neutralizzano una parte dell'acido aggiunto. I campioni con un contenuto di umidità superiore al 10% in peso potrebbero non essere adatti a questa procedura poiché l'eccessiva umidità diluirebbe l'acido aggiunto. I campioni contenenti proteine possono restituire un valore di concentrazione della lignina più alto del reale, a meno che la proteina non sia considerata nella determinazione gravimetrica del materiale insolubile in acido. Questa procedura non è adatta per campioni contenenti un acido, una base o altro catalizzatore aggiunto.

I campioni contenenti un alto contenuto di amido rappresentano un'ulteriore problematica in quanto l'amido viene idrolizzato a glucosio utilizzando i metodi a base di acido solforico. Poiché i carboidrati strutturali vengono analizzati come monomeri, non è noto quale tipo di polimero abbia dato origine a ciascun tipo di monosaccaride. Il contenuto di amido della maggior parte delle materie prime erbacee o legnose prive di semi è basso, quindi si presume che il glucosio misurato provenga dalla cellulosa. Per le materie prime che possono contenere quantità di amido significative il metodo prescrive

di svolgere, separatamente, una prova consistente in una idrolisi enzimatica del campione per degradare il solo amido. Gli zuccheri di cellulosa ed emicellulosa vengono stimati dalle differenze dei valori di idrolisi: totale e del solo amido.

3.3 Metodo standard NREL

3.3.1 Scopo dell'analisi e procedura

Questa procedura permette l'ottenimento di dati quantitativi in merito alla presenza di carboidrati strutturali e lignina contenuti in un campione di biomassa solido. Questo metodo prevede l'analisi di un campione privo di estrattivi. Se nella biomassa è presente dell'emicellulosa contenente uno scheletro di xilano si rende necessaria un'ulteriore analisi in merito alla quantità di acetile.

3.3.2 Preparazione del campione

- 1.1 Preparare il campione per l'analisi e idrolizzarlo.
- 1.2 Mettere un numero adeguato di crogioli filtranti nel forno a muffola a 575 ± 25 °C per un minimo di quattro ore. Rimuovere i crogioli dal forno e raffreddarli per un'ora in un essiccatore. Pesare i crogioli con approssimazione di 0,1 mg e registrare la misura.
- 1.3 Rimettere il crogiolo nel forno a muffola a 575 ± 25 °C e portare la cenere a peso costante¹.
- 1.4 Pesare $300,0 \pm 10,0$ mg del campione o dello standard QA in un tubo a pressione tarato e registrare il peso con approssimazione di 0,1 mg. Contemporaneamente va eseguito il LAP "Determinazione dei solidi totali nella biomassa" per misurare accuratamente la percentuale di solidi per la correzione. Ogni campione deve essere analizzato almeno in duplicato.
- 1.5 Scaldare il tubo a pressione a bagnomaria impostando a 30 ± 3 °C e incubare il campione per 60 ± 5 minuti. Agitare il campione ogni cinque o dieci minuti senza rimuovere il campione dal bagno, essenziale per garantire un contatto uniforme tra acido e particelle nonché un'idrolisi uniforme.
- 1.6 Aggiungere 0,01 ml (o $4,92 \pm 0,01$ g) di acido solforico al 72% in ciascuna provetta a pressione, utilizzando un'asta di agitazione in teflon per mescolare per un minuto o fino a quando il campione non è completamente miscelato.
- 1.7 Al termine dell'idrolisi di 60 minuti, rimuovere i tubi dal bagnomaria.

¹ Variazione del peso inferiore a $\pm 0,3$ mg dopo un'ora dal riscaldamento del crogiolo.

- 1.8 Diluire l'acido a una concentrazione del 4% aggiungendo $84,00 + 0,04$ ml di acqua deionizzata utilizzando una buretta automatica. La diluizione può essere effettuata anche aggiungendo $84,00 + 0,04$ g di acqua purificata utilizzando una bilancia con una precisione di 0,01 g.
- 1.9 Mescolare il campione capovolgendo più volte la provetta per eliminare la separazione di fase tra gli strati di acido ad alta e bassa concentrazione.
- 1.10 Preparare una serie di standard di recupero dello zucchero (SRS) che verranno presi attraverso l'idrolisi rimanente e utilizzati per correggere le perdite dovute alla distruzione degli zuccheri durante l'idrolisi acida diluita. L'SRS dovrebbe includere D-(+)glucosio, D-(+)xilosio, D-(+)galattosio, -L-(+)arabinosio e D-(+)mannosio.
- 1.11 Pesare le quantità necessarie di ciascuno zucchero, con l'approssimazione di 0,1 mg, e aggiungere 10,0 ml di acqua deionizzata. Aggiungere poi 348 μ l di acido solforico al 72%. Trasferire l'SRS in un tubo a pressione e tappare ermeticamente.
- 1.12 Non è necessario un nuovo SRS per ogni analisi. Un grande lotto di standard di recupero dello zucchero può essere prodotto, filtrato attraverso filtri da 0,2 μ m, dispensato in aliquote da 10,0 ml in contenitori sigillati ed etichettato. Possono essere conservati in congelatore e rimosso quando necessario. Scongelare e agitare l'SRS congelato prima dell'uso. Se vengono utilizzati SRS congelati, la quantità appropriata di acido deve essere aggiunta al campione scongelato e agitato su vortice prima del trasferimento in una provetta a pressione.
- 1.13 Mettere le provette in un rack adatto al trattamento in autoclave. Trattare in autoclave i campioni sigillati e gli standard di recupero dello zucchero per un'ora a 121°C. Dopo il completamento del ciclo lasciare che gli idrolizzati si raffreddino lentamente a temperatura ambiente prima di rimuovere i cappucci.

3.3.3 Analisi per la lignina insolubile in acido

- 2.1 Filtrare sottovuoto la soluzione di idrolisi attraverso uno dei crogioli filtranti precedentemente pesati e raccogliere il filtrato in un pallone filtrante.
- 2.2 Trasferire un'aliquota, circa 50 ml, in una bottiglia di conservazione del campione. Questo campione verrà utilizzato per determinare la lignina

solubile in acido, nonché i carboidrati e l'acetile se necessario. La determinazione della lignina solubile in acido deve essere effettuata entro sei ore dall'idrolisi².

- 2.3 Utilizzare acqua deionizzata per trasferire quantitativamente tutti i solidi rimanenti dal tubo a pressione nel crogiolo di filtraggio. Sciacquare i solidi con un minimo di 50 ml di acqua deionizzata fresca. L'acqua calda deionizzata può essere utilizzata al posto dell'acqua a temperatura ambiente per ridurre il tempo di filtrazione.
- 2.4 Asciugare il crogiolo e il residuo insolubile in acido a 105 ± 3 °C fino a raggiungere un peso costante.
- 2.5 Rimuovere i campioni dal forno e raffreddare in un essiccatore, registrando il peso del crogiolo e del residuo secco con approssimazione di 0,1 mg.
- 2.6 Mettere i crogioli e il residuo nel forno a muffola a 575 ± 25 °C per 24 ore.
- 2.7 Rimuovere con cautela il crogiolo dal forno e raffreddarlo in un essiccatore per un'ora. Pesare i crogioli e la cenere con l'approssimazione di 0,1 mg e registrare il peso. Rimettere i crogioli nella fornace con la cenere a un peso costante³.

3.3.4 Analisi per la lignina solubile in acido

- 3.1 Su uno spettrofotometro UV-Vis, eseguire una misurazione di base di acqua deionizzata o acido solforico al 4%.
- 3.2 Utilizzando l'aliquota del liquido di idrolisi misurare l'assorbanza del campione a una lunghezza d'onda appropriata sullo spettrofotometro. Fare riferimento alla sezione per i valori di lunghezza d'onda suggeriti. Diluire il campione secondo necessità per portare l'assorbanza nell'intervallo 0,7 – 1,0 e registrare la diluizione. Per diluire il campione è possibile utilizzare acqua deionizzata o acido solforico al 4%, ma lo stesso solvente deve essere utilizzato come base di misurazione.

² Il liquido può essere conservato in frigorifero per un massimo di due settimane.

³ La quantità di ceneri insolubili acide non è uguale alla quantità totale di ceneri nel campione di biomassa. Fare riferimento al LAP "Determinazione delle ceneri nella biomassa" se si desidera determinare le ceneri totali.

3.3 Registrare l'assorbanza con tre cifre decimali. La riproducibilità dovrebbe essere + 0,05 unità di assorbanza. Ogni campione deve essere analizzato almeno in duplicato⁴.

3.3.5 Analisi per i carboidrati strutturali

4.1 Preparare una serie di standard di calibrazione contenenti i composti da quantificare⁵. Utilizzare una calibrazione a quattro punti. Se gli standard vengono preparati al di fuori degli intervalli suggeriti, è necessario convalidare il nuovo intervallo per queste curve di calibrazione. Si possono preparare gli standard in un lotto unico, filtrando a 0,2 µm in fiale di autocampionatore, sigillato ed etichettato. Gli standard e i campioni CVS possono essere conservati in un congelatore e rimossi quando necessario.

4.2 Scongela (eventualmente) e vorticare gli standard congelati prima dell'uso. Durante ogni utilizzo, gli standard e i campioni CVS devono essere osservati per accertare l'assenza di concentrazioni insolite, caratteristica di campioni compromessi.

4.3 Preparare uno standard di verifica della calibrazione (CVS) indipendente per ogni serie di standard di calibrazione. Preparare il CVS a una concentrazione che rientra nel mezzo dell'intervallo convalidato della curva di calibrazione. Il CVS deve essere analizzato sull'HPLC dopo ogni set di calibrazione e ad intervalli regolari durante tutta la sequenza. Il CVS viene utilizzato per verificare la qualità e la stabilità delle curve di calibrazione durante tutta la corsa.

4.4 Utilizzare il liquido di idrolisi ottenuto e trasferire un'aliquota di circa 20 ml di ciascun campione in un matraccio Erlenmeyer da 50 ml.

4.5 Usare carbonato di calcio per neutralizzare ciascun campione a pH 5 – 6. Aggiungere lentamente il carbonato di calcio dopo aver raggiunto un pH di 4, agitando frequentemente il campione. A neutralizzazione avvenuta lasciare sedimentare il campione e decantare il supernatante. Il pH del liquido dopo la decantazione sarà di circa 7⁶.

4.6 Preparare il campione per l'analisi HPLC filtrando il liquido decantato a 0,2 µm e ponendolo in una fiala dell'autocampionatore sigillata ed etichettata. Preparare

⁴ Questo passaggio deve essere fatto entro sei ore dall'idrolisi.

⁵ Facendo riferimento alla tabella 1 per l'intervallo di concentrazione suggerito.

⁶ I campioni non dovrebbero mai superare un pH di 9, poiché ciò comporterà una perdita di zuccheri.

ogni campione in duplicato, riservando uno dei duplicati per un'analisi successiva. Se necessario, i campioni neutralizzati possono essere conservati in frigorifero per quattro giorni⁷. Dopo la conservazione a freddo, controllare i campioni per la presenza di un precipitato. I campioni contenenti un precipitato devono essere nuovamente filtrati, mentre sono ancora freddi, sempre attraverso filtri da 0,2 µm.

- 4.7 Controllare i cromatogrammi del campione di prova per la presenza di cellobiosio e zuccheri oligomerici. Livelli di cellobiosio superiori a 3 mg/ml indicano un'idrolisi incompleta. I campioni freschi devono essere idrolizzati e analizzati.
- 4.8 Controllare i cromatogrammi del campione di prova per la presenza di picchi che eluiscono prima del cellobiosio⁸. Questi picchi possono indicare livelli elevati di prodotti di degradazione dello zucchero nel campione precedente, il che è indicativo di un'idrolisi eccessiva.

3.3.5 Analisi per il contenuto di acetile

- 5.1 Preparare acido solforico 0,005 M (0,01 N) per l'uso come fase mobile HPLC. In un matraccio tarato da 2 litri, aggiungere 2,00 ml di acido solforico 10 N standardizzato e portare a volume con acqua di grado HPLC. Filtrare a 0,2 µm e degassare prima dell'uso.
- 5.2 Preparare una serie di standard di calibrazione contenenti i composti da quantificare. Si consiglia l'acido acetico, acido formico e acido levulinico sono opzionali. Si suggerisce un intervallo da 0,02 a 0,5 mg/ml. Una calibrazione a quattro punti uniformemente distanziata. Se gli standard vengono preparati al di fuori degli intervalli suggeriti, è necessario convalidare il nuovo intervallo per queste curve di calibrazione.
- 5.3 Preparare uno standard di verifica della calibrazione (CVS) indipendente per ciascuna serie di standard di calibrazione, utilizzando componenti ottenuti da una fonte diversa da quella utilizzata nella preparazione degli standard di calibrazione. Il CVS deve contenere quantità note di ciascun composto contenuto negli standard di calibrazione, ad una concentrazione che ricade nel

⁷ Trascorso questo tempo, i campioni devono essere considerati compromessi a causa della potenziale crescita microbica.

⁸ tempo di ritenzione di 4-5 minuti utilizzando le condizioni consigliate.

mezzo dell'intervallo validato della curva di calibrazione. Il CVS deve essere analizzato sull'HPLC dopo ogni set di calibrazione e ad intervalli regolari durante tutta la sequenza, raggruppando gruppi di campioni. Il CVS viene utilizzato per verificare la qualità e la stabilità della curva di calibrazione per tutta la corsa.

- 5.4 Preparare il campione per l'analisi HPLC facendo passare una piccola aliquota del liquido attraverso un filtro da 0,2 μm in una fiala di autocampionatore. Se si sospetta che le concentrazioni del campione possano superare l'intervallo di calibrazione, diluire i campioni secondo necessità, registrando la diluizione. Le concentrazioni devono essere corrette per la diluizione dopo l'esecuzione.
- 5.5 Analizzare gli standard di calibrazione, CVS e campioni mediante HPLC utilizzando una colonna Biorad Aminex HPX-87H dotata della colonna di guardia appropriata.

3.3.6 Possibili interferenze a una corretta analisi

La metodologia appena descritta è ottimizzata per campioni con dimensioni delle particelle specificate nel LAP "Preparazione dei campioni per l'analisi compositiva della biomassa". L'analisi di particelle di dimensioni più piccole può comportare una distorsione del contenuto di carboidrati⁹ a causa dell'eccessiva degradazione degli stessi. Anche l'analisi di particelle di dimensioni più grandi può comportare una distorsione nel contenuto di carboidrati, a causa dell'idrolisi incompleta degli zuccheri polimerici in zuccheri monomerici.

I campioni contenenti estrattivi non sono adatti per questa procedura, così come quelli con un contenuto di ceneri superiore al 10% in peso. Questo perché il campione potrebbe contenere terreno o altri minerali che interferirebbero con le concentrazioni acide e potrebbero catalizzare reazioni collaterali.

I campioni con un contenuto di umidità superiore al 10% in peso non sono adatti a questa procedura, poiché l'umidità in eccesso interferirebbe con le concentrazioni di acido. I campioni devono essere asciugati prima di questa procedura.

⁹ Questo porterebbe conseguentemente ad una elevata distorsione della misurazione della lignina.

I campioni contenenti proteine distorcerebbero in modo eccessivo di lignina insolubile in acido a meno che la proteina non venga considerata nella determinazione gravimetrica del materiale insolubile in acido. È necessaria un'analisi dell'azoto indipendente per stimare il contenuto proteico del residuo. La stima delle proteine viene quindi sottratta dalla misurazione del residuo insolubile in acido. La separazione fisica della proteina insolubile dalla lignina insolubile esula dallo scopo di questa procedura.

Questa procedura non è adatta per campioni contenenti acidi, basi o catalizzatori aggiunti.

3.3.7 Aree di possibile miglioramento nell'analisi della biomassa

La ricerca di nuove e migliori metodologie di analisi per quantificazione dei componenti più accurate, produttività dei campioni più alte e complessità analitiche ridotte è continua. Tuttavia, dall'analisi dei metodi e delle procedure NREL possono essere identificate tre macroaree di intervento su cui lavorare in un imminente futuro per elevare ulteriormente la qualità di analisi e risolvere le problematiche attuali.

Prima di tutto, come appena detto, sono necessari metodi nuovi o migliorati per caratterizzare meglio i componenti esistenti o per rilevare i componenti che non vengono acquisiti utilizzando le procedure correnti. Sarebbe utile, ad esempio, un metodo per quantificare in modo specifico la lignina rispetto all'attuale metodo gravimetrico, il quale potrebbe essere soggetto a interferenze. Il metodo del residuo insolubile in acido è poco preciso perché tutti i solidi non idrolizzati finiscono per essere contati con la lignina. Inoltre, una piccola ma utile correzione potrebbe essere apportata con la messa a punto di un metodo per misurare la proteina che coprecipita con la lignina insolubile in acido.

Circa un quinto della lignina nella biomassa viene solubilizzato durante l'idrolisi analitica. Per misurarla viene utilizzata la spettroscopia UV, tuttavia, questo metodo è soggetto a interferenze da altri componenti che assorbono nella regione UV (ad esempio, HMF e furfurolo). Altri metodi come la risonanza magnetica nucleare (NMR), l'adsorbimento selettivo o l'HPLC possono essere utilizzati per determinare il contenuto di ASL in modo più specifico.

Gli acidi uronici normalmente non vengono misurati nella suite di analisi NREL. Una parte di essi però è presente come coniugati di zucchero dopo l'idrolisi analitica (ad esempio, 4-O-metilglucuronossilosio). Mentre l'HPLC sembra promettente per l'analisi dell'acido uronico, la mancanza di standard commerciali ne rende difficile la quantificazione.

Trovare un metodo migliore per misurare gli zuccheri degradati durante l'idrolisi migliorerebbe l'analisi dei carboidrati. Come precedentemente detto l'uso di zuccheri monomerici per correggere le perdite di zucchero da polimeri durante l'idrolisi è una metodologia poco precisa.

La seconda grande area di miglioramento è la necessità di aumentare il throughput e l'efficienza di questi metodi per consentire analisi più rapide e convenienti.

Un'alternativa sarebbe automatizzare l'idrolisi a due stadi che è il fulcro della procedura di misurazione dei carboidrati e della lignina. Sarebbe auspicabile anche la messa a punto di metodi più rapidi per l'analisi delle ceneri nella materia prima e dei residui insolubili in acido. Gli attuali metodi HPLC per l'analisi dei monosaccaridi dalla biomassa possono richiedere più di 45 minuti di tempo di esecuzione per campione. Nuove fasi stazionarie HPLC oltretutto potrebbero migliorare la produttività e la risoluzione degli zuccheri della biomassa.

Sarebbero necessari miglioramenti verso la separazione di base degli zuccheri della biomassa e tempi di separazione più rapidi. Una maggiore sensibilità analitica migliorerebbe la quantificazione degli zuccheri "minori" della biomassa (galattosio, arabinosio e mannosio). Altre tecniche strumentali potrebbero consentire misurazioni migliori e più rapide pur mantenendo la facilità d'uso del metodo attuale.

La terza area di potenziale miglioramento consiste nell'adattamento dei metodi descritti a una più ampia varietà di substrati di biomassa, alterando i metodi o sviluppando nuovi metodi quando necessario. Ciò include materiali da residui industriali (ad es. fibra di mais e rifiuti solidi urbani) e materie prime di biocarburanti emergenti. Questi test possono rivelare la necessità di analizzare nuove componenti, in aggiunta alle precedenti. Ad esempio, la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) accoppiata a metodi di calibrazione multivariati è stata sviluppata e sperimentata per caratterizzare la biomassa. La scansione spettroscopica è più veloce e tecnicamente più semplice per la

generazione di dati compositivi. Per ottenere un modello NIR ben calibrato è necessaria una grande mole di dati, ottenibili con attente metodologie di analisi e numerose prove sperimentali.

4 Semplificazioni possibili

Al fine di rendere le analisi più semplici, veloci ed accessibili anche a piccole realtà sono state identificate delle procedure alternative più economiche, rapide e facilmente gestibili.

4.1. Semplificazione del metodo NREL

Vengono di seguito proposte due soluzioni per semplificare il metodo NREL eliminando o modificando alcune delle pratiche più complesse.

4.1.1. Eliminazione parziale o totale della fase di determinazione degli estrattivi

Per quanto riguarda i materiali lignocellulosici provenienti dalla filiera vitivinicola, quasi tutti di tipo legnoso, una prima semplificazione potrebbe consistere nell'effettuare una sola estrazione con etanolo invece della doppia estrazione acqua/etanolo. Come suggerito anche dal relativo LAP, per il trattamento delle biomasse legnose è sufficiente la sola estrazione con etanolo, al fine di eliminare composti che potrebbero interferire con le successive analisi. L'estrazione acquosa in questo caso può essere evitata in quanto prerogativa soprattutto di biomasse erbacee o con livelli apprezzabili di zuccheri liberi nel campione.

4.1.2. Idrolisi dei carboidrati strutturali a temperature inferiori ai 100°C e pressione atmosferica

Un'ulteriore semplificazione potrebbe consistere nell'effettuare l'idrolisi analitica a pressione atmosferica e temperature inferiori a quelle del metodo tradizionale.

Questo tipo di approccio è stato già esaminato da un team di ricercatori coreani che hanno analizzato la resa di glucosio e xilosio effettuando idrolisi a diverse concentrazioni di acido (dal 60 all'80% in peso) e diverse temperature (tra gli 80 e i

100°C). Nelle prove con acido poco concentrato (65-70% in peso), la produzione di glucosio risulta inferiore a quella dello xilosio. Quest'ultimo infatti, derivato principalmente dall'emicellulosa, si libera più velocemente del glucosio che in questo caso si trova per la maggior parte ancora in forma oligomerica (cellobiosio). Gli esperimenti successivi hanno confermato una relazione di proporzionalità diretta tra la concentrazione di acido e il rapporto glucosio/xilosio fino alla combinazione limite 80% in peso e 100°C. L'analisi di diverse tipologie di biomassa, pur riscontrando delle differenze nella resa in zucchero dettate da una differente struttura dell'emicellulosa, ha portato a risultati comparabili sia per legni teneri (pino) che per legni duri (quercia).

L'aumento della concentrazione di acido è generalmente un modo più efficace per massimizzare la resa complessiva di zucchero rispetto all'aumento della temperatura di esercizio (Hong e al. 2013). Bisogna tuttavia tenere presente il limite massimo (identificato in questo caso nel valore di 80% in peso) al fine di evitare la degradazione degli zuccheri.

L'aumento della temperatura invece generalmente abbassa la resa complessiva di zucchero, aumentando però il rapporto glucosio/xilosio. Quest'ultimo fatto si verifica fino alla temperatura di 80°C per l'aumento della concentrazione di glucosio, a 100°C invece la causa dell'aumento del rapporto è una diminuzione dello xilosio, con conseguente diminuzione della resa. Lo xilosio, infatti, è più suscettibile del glucosio a causa della struttura amorfa dell'emicellulosa, e si degrada a furaldeide ad alte temperature.

Dal loro studio si evince come i parametri ottimali per la conduzione dell'idrolisi consistano in una concentrazione di acido compresa tra il 70 e l'80% in peso e una temperatura di 80°C. Questi valori garantiscono la migliore resa complessiva in zuccheri, nonché un alto rapporto glucosio/xilosio principalmente grazie alla scarsa formazione di prodotti di degradazione degli zuccheri. A questo proposito risulta molto rilevante anche il periodo di permanenza del campione nelle condizioni di idrolisi. Sempre onde evitare fenomeni di degradazione indesiderati e mantenendo un'alta resa il parametro temporale ottimale identificato è di 30 minuti. E' stato osservato infatti come la produzione di zuccheri fermentescibili avvenga principalmente nella fase di riscaldamento, dove si ottiene la massima velocità di idrolisi del cellobiosio, e non una volta raggiunta la temperatura designata (80 o 100°C).

Applicando un'idrolisi con questi parametri all'analisi standard il processo si semplifica notevolmente, inoltre non risulta più necessaria l'autoclave, per la quale sono indispensabili tubi per pressione stagni.

4.2. Metodi approssimati

I due metodi qui proposti come approssimati mirano a sostituire le laboriose analisi analitiche dei metodi standard con delle stime meno precise ma notevolmente più semplici da eseguire.

4.2.1. Analisi degli zuccheri totali

L'analisi degli zuccheri totali permetterebbe una stima dei monomeri presenti nel campione, col vantaggio dell'utilizzo di un metodo relativamente semplice e veloce.

Pur non riuscendo a discriminare gli esosi dai pentosi (entrambi comunque fermentescibili) tramite questa analisi si avrebbe a disposizione, con buona approssimazione, una panoramica del contenuto zuccherino totale.

Questo tipo di analisi potrebbe risultare ancora più coerente se effettuata nell'ambito di un successivo processo di cofermentazione.

4.2.2. Analisi delle specie fenoliche

Un'ultima interessante semplificazione potrebbe consistere in un'analisi dei fenoli totali per la quantificazione della lignina, eliminando totalmente l'idrolisi analitica. Questa analisi si baserebbe sul metodo messo a punto da Ludovico Pontoni e colleghi che nel 2017 hanno adattato il test colorimetrico di Folin-Ciocalteu a campioni solidi.

Come illustrato dai ricercatori lo step chiave di questo metodo è la diluizione solida. Applicando il test colorimetrico al liquido di idrolisi del campione contenente lignina (o sostanze fenoliche in generale), infatti, la qualità dei dati ottenuta dalla misurazione dipende dai composti disciolti e quindi dalla resa di estrazione del solvente. Il problema relativo a questa procedura è che, sostanzialmente, viene misurata la concentrazione di composti estratti, mentre quelli rimasti all'interno della matrice del campione non vengono considerati.

La soluzione a questo inconveniente può risiedere nell'utilizzo dei metodi QUENCHER (Quick, Easy, New, Cheap, and Reproducible treatment). Essi si basano sull'analisi diretta di campioni solidi mescolati con radicali liberi o altri ossidanti. Operando in questo modo è possibile calcolare la TAC senza alcuna estrazione preliminare.

L'idea è che i gruppi fenolici legati dalla matrice possano essere forzati a dissolversi dai reagenti ossidanti (Pontoni et al., 2017). In questo modo il principale fattore che influenza l'efficacia della reazione di colorazione è l'accessibilità dei composti ossidabili, pertanto, la preparazione del campione gioca un ruolo essenziale nella quantificazione dei componenti insolubili della matrice. Viene aggiunto al campione del solfato di sodio, che funge da agente diluente, prima dell'omogeneizzazione. Il metodo consente l'analisi di quantità significative di campione, riducendo i problemi legati all'eterogeneità dello stesso e fornendo una buona accuratezza e riproducibilità.

Gli esperimenti condotti con questo metodo hanno inoltre evidenziato concentrazioni fenoliche maggiori rispetto alle metodologie tradizionali ponendo l'accento sul fatto che, queste ultime, possano sottostimare il contenuto di lignina nei campioni. I metodi QUENCHER potrebbero quindi non essere solo una via di semplificazione dei metodi standard ma una vera e propria alternativa ad essi, potenzialmente anche più accurata.

Come considerazione finale bisogna inoltre tenere a mente che, ad oggi, le analisi tradizionali non sono in grado di incorporare efficacemente nuovi trattamenti o processi non standard offrendo un'adeguata affidabilità dei risultati. Preso atto di questo è preferibile operare con metodi rapidi anche se approssimativi, piuttosto che non avere dati a disposizione o avere dati non affidabili. E' evidente come adottare metodi semplici è più agevole e proficuo di complicate metodiche ricche di passaggi e possibili problematiche.

Appendice A

Composizione delle biomasse residuali della filiera vitivinicola

Biomassa	Zuccheri totali (g/Kg peso umido)	Zuccheri fermentescibili (g/Kg peso umido)	Etanolo potenziale da zuccheri semplici (Kg/t residuo umido)
Vinaccia bianca con raspi	103,348	103,340	8,102
Raspo d'uva	36,984	36,984	18,122
Vinaccia non fermentata da uve bianche	70,126	70,126	34,362
Vinaccia fermentata da uve rosse	7,102	7,014	3,437
Tralci di vite	17,290	17,236	8,440
Tralci di vite (Garganega)	3,970	3,872	1,900
Tralci di vite (Valpolicella)	2,900	2,870	1,406

Tabella A.1 Contenuto zuccherino di residui lignocellulosici nei sottoprodotti della filiera vitivinicola (dati relativi al progetto Biorivaluta).

Biomassa	Sostanza secca totale (%)	Ceneri (% sul secco)	Emicellulosa (% sul secco)	Cellulosa (% sul secco)	Lignina (% sul secco)	Amido (% sul secco)	Etanolo potenziale da polisaccaridi (Kg/t)
Vinaccia bianca con raspi	34,65	5,21	7,87	14,82	21,97	1,08	27
Raspo d'uva	25,15	7,34	11,06	10,72	15,95	0,85	10,53
Vinaccia bianca	41,34	4,58	8,43	12,25	33,55	0,95	28
Vinaccia rossa fermentata	35,67	5,32	12,35	14,67	31,61	0,93	28,5
Tralci di vite	60,05	3,20	20,21	36,17	16,66	0,99	114,1
Tralci di vite (Garganega)	87,87	3,53	20,38	40,25	17,05	0,90	184,8
Tralci di vite (Valpolicella)	79,19	3,28	19,98	41,74	16,78	0,90	172,6
Potatura verde (Chardonnay)	21,25	4,57	12,81	24,43	16,84	Nd	26,5
Potatura verde (Cabernet Sauvignon)	26,93	6,23	15,47	27,67	14,30	1,19	39,8

Tabella A.2 Parametri composizionali di residui lignocellulosici nei sottoprodotti della filiera vitivinicola (dati relativi al progetto Biorivaluta).

Bibliografia

Castelli S., Sala C., Negri M., Mundula S., Sozzi F., Balsari P., Menardo S., Gioielli F., Schievano A., Ledda C., D'imporzano G., Adani F., Navarotto P., Zaffrani G., Dinuccio Elio., Barone F., Garuti G., Gusella N., Noia D., Stern A., Gallopin F., David M., Facciotto G., Fiala M., Bacenetti J., Pennati G., Valagussa M., Pozzi A., Mapelli S., Pecchia P., Galasso I., Ravasio N., Zaccheria F., Compagno C., Motto M., Molinari F., Locatelli S. & Forlini F. 2011. Biomasse ed energia. Santarcangelo di Romagna (RN): Maggioli s.p.a. - Maggioli Editore

Cicci, A., Sed, G., Jessop, P. G., & Bravi, M. (2018). Circular extraction: an innovative use of switchable solvents for the biomass biorefinery. *Green Chemistry*, 20(17), 3908-3911.

Cunha, I. T., McKeeman, M., Ramezani, M., Hayashi-Mehedy, K., Lloyd-Smith, A., Bravi, M., & Jessop, P. G. (2022). Amine-free CO₂-switchable hydrophilicity solvents and their application in extractions and polymer recycling. *Green Chemistry*, 24(9), 3704-3716.

Sed, G., Cicci, A., Jessop, P. G., & Bravi, M. (2018). A novel switchable-hydrophilicity, natural deep eutectic solvent (NaDES)-based system for bio-safe biorefinery. *RSC advances*, 8(65), 37092-37097.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. L. A. P. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, 1617(1), 1-16.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. L. A. P. (2010). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, (TP-510-42618).

Sluiter, J. B., Ruiz, R. O., Scarlata, C. J., Sluiter, A. D., & Templeton, D. W. (2010). Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(16), 9043-9053.

Templeton, D. W., Wolfrum, E. J., Yen, J. H., & Sharpless, K. E. (2016). Compositional analysis of biomass reference materials: results from an interlaboratory study. *Bioenergy research*, 9(1), 303-314.

Wijaya, Y. P., Putra, R. D. D., Widyaya, V. T., Ha, J. M., Suh, D. J., & Kim, C. S. (2014). Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 164, 221-231.

Zimbardi, F., Viola, E. & Ricci, E. (2001). Etanolo da biomasse lignocellulosiche. 10.13140/RG.2.1.1155.9925.