



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA, ANIMALI,  
ALIMENTI, RISORSE NATURALI E AMBIENTE

Corso di Laurea Triennale in  
Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

Tesi di Laurea Triennale

Biofrazionamento dei tralci mediante l'uso di  
solventi eutettici naturali

Biofractionation of shoots using natural eutectic  
solvents

Relatore  
Prof. Marco BRAVI  
Correlatore  
Prof. Simone VINCENZI

Laureando  
Giorgio Barollo  
Matricola n.1233719

ANNO ACCADEMICO 2021-2022



# INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	
<b>ABSTRACT</b> .....	
<b>SCOPO DEL LAVORO</b> .....	
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LA TECNOLOGIA DI PRODUZIONE DEL BIOETANOLO LIGNOCELLULOSICO</b> .....	<b>4</b>
2.1 LA BIOMASSA LIGNOCELLULOSICA .....	6
2.2 I PROCESSI PRINCIPALI PER LA PRODUZIONE DI BIOETANOLO.....	8
2.2.1 <i>Il pretrattamento: importanza e problematiche</i> .....	15
2.3 IL RIUTILIZZO DEGLI ENZIMI.....	16
2.4 RESE E BILANCIO ENERGETICO NETTO .....	16
<b>3. I SOLVENTI EUTETTICI E INVERTIBILI</b> .....	<b>18</b>
3.1 I SOLVENTI TRADIZIONALI.....	18
3.2 I SOLVENTI EUTETTICI .....	20
3.2.1 <i>I metodi di preparazione dei solventi eutettici</i> .....	22
3.2.2 <i>I solventi eutettici naturali</i> .....	23
3.3 I SOLVENTI INVERTIBILI .....	27
3.3.1 <i>Switchable polarity solvents (SPS)</i> .....	28
3.3.2 <i>Switchable hydrophilic solvents (SHS)</i> .....	30
<b>4. IL PRETRATTAMENTO DEI LIGNOCELLULOSICI MEDIANTE SOLVENTI EUTETTICI</b> .....	<b>34</b>
4.1 CARATTERISTICHE DELLA MATERIA PRIMA DA BIOMASSA.....	37
4.1.1 <i>Cristallinità della materia prima da biomassa</i> .....	39
4.1.2 <i>Dimensione delle particelle di materia prima da biomassa</i> .....	40
4.2 CARATTERISTICHE DEL DES .....	41
4.2.1 <i>Effetti delle caratteristiche dell'HBD sul pretrattamento</i> .....	41
4.2.2 <i>Effetto del rapporto molare HBA e HBD sul pretrattamento con DES</i> ....	44
4.3 CONDIZIONI DI REAZIONE DEL PRETRATTAMENTO .....	44
4.3.1 <i>Effetto del rapporto tra solido e liquido sul pretrattamento DES</i> .....	45
4.3.2 <i>Effetto della temperatura</i> .....	46
4.3.3 <i>Effetto del tempo di pretrattamento</i> .....	47
4.3.4 <i>Considerazione completa delle condizioni di pretrattamento</i> .....	47
<b>5. CONCLUSIONI</b> .....	<b>49</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>52</b>



## RIASSUNTO

Per far fronte alla crescente domanda di energia, all'esaurimento delle risorse di combustibili fossili e alle preoccupazioni ambientali legate dall'uso di questi ultimi, molti Paesi stanno sviluppando fonti energetiche alternative al petrolio.

Il frazionamento dei materiali lignocellulosici (LCM) è una delle tecnologie di maggiore rilievo nello sviluppo dell'impiego delle risorse rinnovabili per la produzione di biocarburanti e lignina.

Nell'ambito vitivinicolo, sulla base di valutazioni di letteratura sulle potenzialità del territorio veneto, i tralci di potatura costituiscono una delle matrici lignocellulosiche marginali più rappresentate ed il cui smaltimento presenta delle problematiche.

Oggi il bioetanolo prodotto da biomasse lignocellulosiche con tecnologie di seconda generazione è diventato un'alternativa promettente, soprattutto perché le materie prime lignocellulosiche non competono con le colture alimentari o con i terreni agricoli produttivi e sono anche meno costose e più abbondanti delle materie prime agricole convenzionali.

Il processo di conversione della biomassa in bioetanolo è generalmente composto da tre fasi principali: pretrattamento, idrolisi enzimatica e fermentazione.

Dell'intero processo, il pretrattamento è la fase più cruciale poiché ha un grande impatto sull'efficienza della bioconversione complessiva.

Sono state sviluppate numerose strategie di pretrattamento per migliorare la reattività delle cellule e aumentare la resa degli zuccheri fermentescibili.

Gli obiettivi tipici del pretrattamento sono:

- Produrre solidi altamente digeribili per aumentare la resa in zuccheri durante l'idrolisi enzimatica;
- Evitare la degradazione degli zuccheri, compresi quelli derivati dall'emicellulosa;
- Ridurre al minimo la formazione di inibitori per le successive fasi di fermentazione.

Da decenni sono state sviluppate diverse tecnologie di frazionamento degli LCM ma la ricerca è ancora molto attiva allo scopo di diminuire la spesa energetica (derivante

dalla necessità di lavorare ad alte temperature), aumentare la sicurezza e abbassare gli impatti sull'ambiente implicati da tale operazione.

Tra le opportunità di miglioramento della tecnologia di frazionamento vi sono quelle che impiegano nuovi solventi non volatili e delle nuove modalità di utilizzo di questi solventi, potenzialmente favorevoli alla riduzione di tali impatti.

Tra i numerosi metodi di frazionamento i solventi eutettici naturali sono apparsi come solventi *green* con molti vantaggi:

- facilità di preparazione,
- elevata purezza,
- bassa tossicità,
- facile biodegradabilità,
- basso punto di fusione,
- elevata stabilità termica,
- elevata stabilità all'aria.

Per il pretrattamento sono stati identificati anche i liquidi ionici che, a differenza dei classici solventi che sono difficili da recuperare e tossici, offrono un'opzione sostenibile per la solubilizzazione diretta della cellulosa e, inoltre, in condizioni di bassa temperatura.



## **ABSTRACT**

To cope with the growing energy demand, the depletion of fossil fuel resources, and the environmental concerns related to their use, many countries are developing alternative energy sources to oil.

The fractionation of lignocellulosic materials (LCM) is one of the most significant technologies in the development of the use of renewable resources for the production of biofuels and lignin.

In the wine-growing sector, based on literature evaluations on the potential of the Veneto region, pruning shoots are one of the most represented marginal lignocellulosic matrices and their disposal is problematic.

Today, bioethanol produced from lignocellulosic biomass with second-generation technologies has become a promising alternative, especially since lignocellulosic feedstocks do not compete with food crops or productive agricultural land and are also cheaper and more abundant than conventional agricultural feedstocks.

The process of converting biomass into bioethanol generally consists of three main steps: pre-treatment, enzymatic hydrolysis and fermentation.

Of the whole process, pre-treatment is the most crucial step as it has a great impact on the efficiency of the overall bioconversion.

Numerous pre-treatment strategies have been developed to improve cell reactivity and increase the yield of fermentable sugars.

Typical pre-treatment objectives are:

- Produce highly digestible solids to increase sugar yield during enzymatic hydrolysis;
- Avoid degradation of sugars, including those derived from hemicellulose;
- Minimize the formation of inhibitors for subsequent fermentation steps.

Various technologies for fractionating LCM have been developed for decades, but research is still very active with the aim of decreasing energy expenditure (resulting



from the need to work at high temperatures), increasing safety and lowering the environmental impacts involved.

Opportunities for improving fractionation technology include those using new non-volatile solvents and new ways of using these solvents, which are potentially conducive to reducing these impacts.

Among the many fractionation methods, natural eutectic solvents have emerged as green solvents with many advantages:

- easy preparation,
- high purity,
- low toxicity,
- easy biodegradability,
- low melting point,
- high thermal stability,
- high air stability.

Ionic liquids have also been identified for pretreatment, which, unlike classical solvents that are difficult to recover and toxic, offer a sustainable option for the direct solubilization of cellulose and, moreover, under low temperature conditions.



## **SCOPO DEL LAVORO**

Questa tesi mira ad analizzare l'utilizzo di nuovi solventi eutettici naturali nel frazionamento di biomasse lignocellulosiche con lo scopo di evidenziare i vantaggi della loro applicazione.



# 1. INTRODUZIONE

In questo mio percorso di studi triennale in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche, ho imparato che la vinificazione è un processo tecnologico che trasforma il mosto ricavato dalla spremitura delle uve (materia prima) in vino (prodotto finale) con un'inevitabile produzione di "scarti". Nel tempo, si è riusciti a trasformare la maggior parte di questi cascami in sottoprodotti, cioè residui di produzione che possono essere gestiti come beni e non come rifiuti a beneficio sia dell'ambiente, aumentando la sostenibilità, sia dell'economia, creando guadagno.

I vinaccioli vengono trasformati in olio, le vinacce in distillati e le fecce in etanolo e acidi organici.

Alcuni rifiuti, però, rimangono e per ricavarne energia vengono semplicemente bruciati.

Grazie al lavoro dei ricercatori e allo sviluppo di nuove tecnologie in ambito industriale, stanno emergendo processi innovativi e nuovi modi per migliorare la sostenibilità e la redditività nell'utilizzo di questi scarti.

Questo è ciò che ho studiato nel corso di "*Winery Biorefinery and Waste Management*" tenuto dal professor Marco Bravi. Ho imparando che ogni residuo di produzione può essere valorizzato, in questo modo si aumenta la circolarità e si riduce ciò che viene considerato un rifiuto.

Per questi motivi l'azienda vitivinicola può essere considerata una vera e propria bioraffineria.

La coltivazione della vite produce inevitabilmente ingenti quantitativi di sarmenti che devono essere smaltiti.

Secondo il CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria), in Italia ci sono circa 652 mila ettari di vigneto.

Secondo gli studi effettuati da AIEL, CIA e il dipartimento Tesaf della Università di Agraria di Padova, si possono ricavare circa 2 tonnellate di sarmenti di vite per ettaro con una umidità, al momento del taglio, di circa il 50%.

Ogni anno i viticoltori, durante il periodo invernale, potano le vigne in modo da mantenere una costanza produttiva. In questo modo le energie della pianta vengono

incanalate correttamente mantenendo un equilibrio tra l'attività vegetativa (*source*) e la fruttificazione (*sink*). Questo procedimento viene effettuato per ottenere una buona qualità dell'uva.

I tralci di potatura hanno natura lignocellulosica. Sono composti da: cellulosa (30%-40%), emicellulosa (17%-28%), lignina (24%-30%), tannini (6%-7%) e possono contenere sostanze fenoliche come gli stilbeni.

Se ci riferiamo all'ambito agricolo, il destino dei sarmenti di potatura è diverso.

Possono essere tagliati a scaglie e interrati, quando sani, in modo da aumentare la quantità di sostanza organica nel terreno oppure possono essere compostati con le vinacce. Un antagonista adatto all'inoculazione può renderli sani contro gli agenti patogeni. Quando malsani, possono essere raccolti e bruciati.

La tecnica del compostaggio è molto utilizzata, è una forma di decadimento aerobico della sostanza organica in humus.

Può essere introdotta una tecnica chiamata *vermicompostig* che prevede l'utilizzo di batteri e lombrichi per aumentare la velocità di compostaggio.

Si è visto che il *vermicomposting* è più efficace, all'incirca del 50% rispetto al compostaggio nudo. L'efficacia è stata misurata dall'indice di umificazione:

$$HI\% = 100 \times (\text{contenuto di acido umico}/\text{TOC})$$

Al di fuori dell'ambito agricolo, vengono impiegate altre metodologie.

L'utilizzo del fuoco è la tecnologia energetica più antica, ma ancora utilizzata dall'uomo per scaldarsi. Tramite i tralci di potatura si possono produrre cippato e pellet, che assumono un potere calorifico superiore alla legna.: legna da ardere 3,4 MWh/t, cippato 4MWh/t, pellet 4,6MWh/t.

Nonostante il processo tecnologico nella produzione di stufe e caldaie a biomassa solida, la combustione di quest'ultima continua ad avere un impatto ambientale negativo, rappresentato dall'emissione di materiale particolato fino e di idrocarburi policiclici aromatici.

Attualmente, si stanno sviluppando soluzioni alternative che non sono solo rinnovabili ma anche sostenibili. Un esempio è la produzione di Bioetanolo, Biometano e

Biodiesel di seconda generazione. Le materie prime utilizzate in questi processi sono biomasse lignocellulosiche come i tralci.

Il frazionamento della lignocellulosa non è semplice e, di conseguenza, si stanno cercando soluzioni non basate sull'impiego dei classici solventi organici. Questi solventi tradizionali non sono in grado di solubilizzare la cellulosa e, inoltre, sono difficili da recuperare a causa della loro volatilità, tossici per chi li utilizza e non sostenibili dal punto di vista ambientale.

## 2. LA TECNOLOGIA DI PRODUZIONE DEL BIOETANOLO LIGNOCELLULOSICO

Per energia rinnovabile si intende l'insieme delle tipologie di energia ottenute da risorse che si rinnovano attraverso processi naturali. Non inquinano e non si esauriscono, dal momento che hanno la capacità di rigenerarsi a fine ciclo. Sono tali:

- Energia solare, rappresenta la fonte rinnovabile più nota. Permette di produrre elettricità partendo dai raggi solari e, per trasformare l'energia solare in elettrica, si serve di impianti fotovoltaici o solari.
- Energia eolica, generata sfruttando il vento. Tramite l'utilizzo di pale eoliche, si sfrutta la forza cinetica del vento per produrre energia meccanica, da cui si genera poi quella elettrica.
- Energia idroelettrica, viene prodotta dai moti dell'acqua. Questa forma di energia veniva utilizzata in passato per far funzionare i mulini. Oggi, tramite turbine, l'energia cinetica prodotta da cascate, fiumi, onde e maree viene trasformata in elettricità.
- Energia da biomasse, si utilizza la frazione biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui di origine biologica provenienti dall'agricoltura, dalla silvicoltura e dalle industrie connesse. Vengono utilizzate per produrre energia termica ed elettrica. Un impianto a biomasse è un sistema che utilizza l'energia rinnovabile ricavata dalle biomasse attraverso tecniche diverse come la combustione diretta delle biomasse, l'estrazione di bioliquido o biogas mediante pirolisi e vie biochimiche o l'estrazione di biogas mediante processi di digestione batterica.
- Energia oceanica, sfrutta il movimento di correnti e maree, o il moto delle onde, per produrre energia elettrica.

A causa del cambiamento climatico, l'aumento delle temperature nel tempo sta modificando i modelli meteorologici e sconvolgendo il normale equilibrio della natura. Questo porta molti rischi per gli esseri umani e per tutte le altre forme di vita sulla terra.



Il riscaldamento globale è causato dalle attività umane che determinano il rilascio nell'atmosfera dei cosiddetti gas serra. Tali gas riflettono la maggior parte dei raggi infrarossi irradiandoli nuovamente sulla terra causando l'effetto serra. Tra le attività umane, la combustione di combustibili fossili è quella con maggiore impatto. Oltre all'emissione di gas serra in atmosfera, provoca il rilascio di inquinanti atmosferici nocivi per l'ambiente e per la salute umana.

Con lo scopo di sostituire l'energia fossile, l'utilizzo e lo sviluppo di fonti di energia alternative è diventato uno dei punti salienti della ricerca scientifico-ambientale.

I biocarburanti offrono la possibilità di ridurre la dipendenza dall'uso dei combustibili fossili favorendo vantaggi ambientali e socioeconomici come lo sviluppo sostenibile e la creazione di nuovi posti di lavoro. Secondo l'agenzia internazionale per l'energia, l'energia da biomassa rappresenta circa il 14% della fornitura mondiale di energia primaria (Cai et al., 2017).

La biomassa lignocellulosica è il materiale più abbondante e rinnovabile al mondo per la produzione di biocarburanti, può essere utilizzata come risorsa combustibile alternativa alle risorse fossili (Cai et al., 2017).

Il bioetanolo è una di quelle risorse alla quale si guarda con grande interesse ed alla quale si può attingere grazie ai tanti scarti o materiali che, al momento, non hanno un'ulteriore destinazione.

Il bioetanolo prodotto può essere di prima o seconda generazione:

- è di prima generazione quando la materia prima utilizzata ha interazioni con la catena alimentare. Ad esempio, quando viene prodotto mediante il completo utilizzo della canna da zucchero o del mais, che però viene sottratto come alimento al bestiame. La materia prima è comune al settore alimentare, e per questo motivo si instaura una competizione con il settore energetico, con conseguente aumento del prezzo del mais o della canna da zucchero. Ciò si riflette ovviamente sul costo del bioetanolo di prima generazione, che quindi non risulta competitivo nei confronti della benzina.
- Il bioetanolo di seconda generazione, invece, utilizza una fonte di glucosio differente che è molto diffusa nel pianeta e poco sfruttata dal punto di vista

della produzione dei biocarburanti: la cellulosa (polimero del glucosio). Il vantaggio di utilizzare la cellulosa sta nel poter sfruttare piante che non hanno alcun valore commerciale o alimentare e che sono in grado di crescere in terre marginali. Per la produzione di bioetanolo di seconda generazione possono essere utilizzati anche i residui agricoli composti da biomassa lignocellulosica, zuccherina e amidacea.

## **2.1 La biomassa lignocellulosica**

Per biomassa generalmente si intende un insieme di organismi animali o vegetali presenti in una certa quantità in un dato ambiente come quello acquatico o terrestre.

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

Le biomasse sono particolarmente importanti in due campi: quello ecologico e quello delle energie rinnovabili, dove rappresentano una fonte di energia di origine biotica.

Le biomasse e i combustibili che ne derivano emettono nell'atmosfera, durante la combustione, una quantità di anidride carbonica più o meno corrispondente a quella che viene assorbita in precedenza dai vegetali durante il processo di crescita. In questo modo si ottiene la *carbon neutrality*, cioè le emissioni totali nette sono uguali a zero, in quanto i gas serra prodotti da un'attività sono bilanciati da azioni che compensano i gas emessi.

L'impiego delle biomasse ai fini energetici non provoca quindi il rilascio di nuova anidride carbonica, principale responsabile dell'effetto serra. Inoltre, data la loro natura, la biodegradabilità costituisce un ulteriore vantaggio per l'ambiente.

Il bioetanolo di seconda generazione deriva dalla fermentazione da parte del lievito del glucosio presente all'interno della cellulosa, la quale però in natura si trova in pochi

casi in forma pura, in quanto sarebbe facilmente esposta agli agenti microbici presenti nell'ambiente che la degraderebbero. Nelle piante la cellulosa fa parte di una struttura più complessa chiamata lignocellulosa, che compone le parti più rigide di una pianta ed è costituita, oltre che dalla cellulosa, da emicellulosa e lignina.

- Cellulosa (tra il 25 e il 60%), molto importante perché composta da zuccheri semplici C6, di conseguenza è molto fermentabile. Questa può avere struttura amorfa o cristallina.
- Emicellulosa, rappresentata da catene più corte rispetto alla cellulosa e quindi più facilmente frammentabile. È un polimero composto da molti zuccheri pentosi, tra cui xilosio e arabinosio, e da pochi esosi. Un'altra caratteristica dell'emicellulosa è che ha struttura amorfa e gli zuccheri di cui è composta sono acetilati.
- Lignina, rappresentata da composti completamente diversi dalla cellulosa, è un polimero organico costituito per lo più da composti fenolici e, non essendo formata da monomeri zuccherini, non è fermentabile. Del resto, non contenendo tanto ossigeno, ha un alto potere calorifero. È composta da una struttura e da legami poco modificabili, è il composto più difficile da degradare e non viene idrolizzata.

La biomassa lignocellulosica è il materiale rinnovabile più abbondante in natura (Mosier et al., 2005) ed ha attirato l'attenzione per la sua capacità di fornire biocarburanti come bioetanolo e biogas. È composta da polimeri di carboidrati (cellulosa ed emicellulosa fondamentalmente) e polimeri aromatici (la lignina). Questi polimeri di carboidrati contengono vari monomeri saccaridici (a cinque o sei atomi di carbonio) e sono legati in maniera molto stretta alla lignina.

La composizione della lignocellulosa dipende fortemente dalla sua origine (tabella 1). Il contenuto di lignina ed emicellulosa della lignocellulosa varia in modo significativo a seconda che derivi da latifoglie, conifere o biomassa erbacea come residui agricoli (Xu & Huang, 2014).

**Table 1** Typical lignocellulosic biomass composition (% dry basis)

	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Pine	43.3	20.5	28.3
Spruce	45.0	22.9	27.9
Douglas fir	44.0	19.2	30.0
Poplar	44.7	18.5	26.4
Eucalyptus	49.5	13.1	27.7
Corn stover	36.8	30.6	23.1
<i>Miscanthus</i>	52.1	25.8	12.6
Wheat straw	44.1	23.8	20.5
Switchgrass	33.5	26.1	17.4

Tabella 1 (Xu & Huang, 2014).

Anche i tralci di potatura sono di natura lignocellulosica e sono frazionati in:

- Cellulosa: 30%--40%
- Emicellulosa: 17%--28%
- Lignina: 24%--30%
- Tannini: 6%--7%

Possono contenere anche sostanze fenoliche come gli stilbeni

## **2.2 I processi principali per la produzione di bioetanolo**

Vi son due vie possibili per la produzione di bioetanolo: il processo termodinamico e il processo biochimico.

La via termodinamica prevede di trasformare le frazioni che compongono la lignocellulosa attraverso reazioni che dipendono dall'ambiente (presenza di ossigeno, acqua e temperatura). Queste reazioni non conservano la natura originale dei materiali e quindi la struttura composta da lignina, cellulosa ed emicellulose si perde andando a formare altri composti che sono costituiti dalla formula elementare del materiale alimentato e dalla quantità di reagenti aggiunta (acqua, ossigeno e temperatura). Questo significa che, se sono presenti zuccheri aggiunti e lignina, li perdiamo.

La via termodinamica, quindi, degrada la matrice originaria e crea una miscela di composti generalmente in stato gassoso, in stato liquido o in più di una fase.

Si può produrre etanolo andando ad utilizzare i gas di sintesi prodotti, ma questo procedimento è poco efficiente.

La via biotecnologica è ritenuta la più percorribile e rispetta maggiormente la definizione di bioraffinazione: una tecnica che tende a suddividere la matrice in ingresso ottenendone delle frazioni o dei composti in modo tale da dare ad ognuna il massimo valore.

Il processo biochimico di conversione della biomassa in bioetanolo consiste in 4 fasi principali:

- Pretrattamento
- Saccarificazione
- Fermentazione
- Separazione dall'etanolo

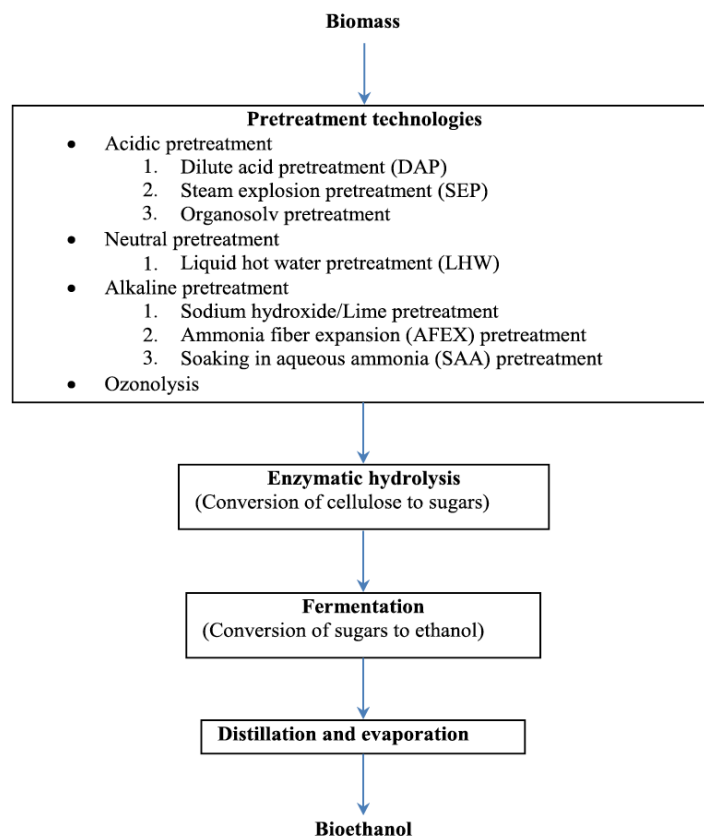


Fig. 1 Schematic flow sheet for the bioconversion of biomass to bioethanol

Fig. 1 (Xu & Huang, 2014).

**Pretrattamento:** dato che il materiale di partenza è la lignocellulosa, che è composta dalle frazioni di cellulosa, emicellulosa e lignina, si ha la necessità di svolgere una prima separazione che viene chiamata pretrattamento. Questa fase dovrebbe portare idealmente a separare le tre frazioni.

I pretrattamenti possono essere di tipo fisico come la macinazione, utile per separare in maniera più spinta le diverse frazioni che vanno a costituire la matrice stessa. Questo tipo di trattamento è molto oneroso e poco considerato.

I veri trattamenti che vengono considerati sono quelli di tipo termodinamico, come la *steam explosion*, e di tipo chimico.

I mezzi di tipo chimico utilizzano il pH per la solubilizzazione delle frazioni che compongono la lignocellulosa. Possono essere utilizzati:

- Mezzi acidificati, di solito acqua con acidi forti
- Mezzi alcalinizzati acqua con basi

Per il pretrattamento si cominciano ad utilizzare anche nuove tipologie di solventi: sia liquidi ionici, ma soprattutto i solventi eutettici naturali.

Quando si ha un processo a umido e a caldo, la matrice lignocellulosica entra in contatto con l'acqua ad alta temperatura. La frazione del materiale stesso composta da emicellulose, però, non è esclusivamente costituita da zuccheri, ma da zuccheri acetilati. Quando questi zuccheri con i gruppi acetile entrano in contatto con le alte temperature e l'acqua, i gruppi acetile si staccano finendo in soluzione acidificandola. Di conseguenza, questo procedimento in condizioni umide e calde, è un processo a tenore acido.

Se la biomassa viene trattata in condizioni acide, la lignina si scioglie e si modifica depositandosi sulle fibre di cellulosa rendendole meno "accessibili" ad eventuali trattamenti con matrici di idrolisi.

Se il trattamento di idrolisi venisse condotto di nuovo per via acida, questo problema di "inaccessibilità" non sarebbe ostativo, ma si avrebbero altri esiti indesiderati: formazione imponente di composti di degradazione degli zuccheri pentosi ed esosi,

FUR e HMF (sono aldeidi), che da un lato consumano parte degli zuccheri fermentabili e dall'altro costituiscono inibitori della fermentazione.

Nel caso in cui la lignocellulosa venga trattata in condizioni alcaline, succede l'esatto contrario: fondamentalmente, soltanto una piccola quota di emicellulosa viene solubilizzata per effetto della temperatura rilasciando in soluzione una piccola quantità di zuccheri a 5 atomi di carbonio. Questi zuccheri in, condizioni alcaline, non vengono degradati ad aldeidi. Ciò che viene solubilizzato in quantità rilevante, in questo caso, è la lignina, mentre la cellulosa e gran parte dell'emicellulosa rimangono legate assieme in una fase solida.

Questi pretrattamenti non hanno soltanto l'obiettivo di frazionare cellulosa, emicellulosa e lignina, cosa che riescono a fare solo in parte, ma hanno l'obiettivo importante di rendere la matrice del materiale più accessibile. Non effettuando un pretrattamento, il materiale risulta essere più compatto e di conseguenza non può essere facilmente raggiunto dagli enzimi (idrolisi enzimatica). Effettuando un pretrattamento, la cellulosa perde buona parte della sua cristallinità e risulta essere più facilmente attaccabile dagli enzimi nella fase successiva.

**Saccarificazione:** a seconda del tipo di pretrattamento utilizzato, si andrà a trattare cellulosa e lignina, se il pretrattamento è stato effettuato in condizioni acide, cellulosa ed emicellulosa, se è stato effettuato in condizioni alcaline.

Il processo di saccarificazione può essere svolto con processi di tipo acido oppure con processi di tipo enzimatico.

La saccarificazione acida è poco costosa e veloce, ma perde una significativa quantità di zuccheri che, degradandosi, formano inibitori (FUR e HMF). Può essere necessario, dunque, applicare un processo di detossificazione. Per questo motivo viene utilizzata una via enzimatica specifica che richiede 5 tipi di enzimi diversi.

Il vantaggio del metodo enzimatico, rispetto al processo di acidificazione, è l'alta resa in zuccheri collegata alla mancata formazione di inibitori e, di conseguenza, l'assente bisogno di un trattamento di detossificazione.

Per contro, i costi del processo aumentano perché gli enzimi sono prodotti di alto valore. Questi enzimi sono commerciati esclusivamente da una coppia di fornitori che costituiscono un duopolo mondiale, in più sono necessari enzimi diversi poiché la cellulasi non riesce ad attaccare l'emicellulosa.

Nel procedimento che segue la via enzimatica, man mano che si accumulano i prodotti di saccarificazione, l'idrolisi rallenta poiché gli zuccheri inibiscono l'azione degli enzimi.

Il problema principale della via enzimatica è relativo ai costi che aumentano anche a causa del comportamento della cellulasi. La cellulasi, dopo aver idrolizzato la cellulosa, torna in soluzione andandosi a legare ad un altro substrato. Se si lega alla lignina, questa non viene idrolizzata e la cellulasi resta attaccata. Si crea un'unione irreversibile lungo tutto il processo che rende difficoltoso il recupero degli enzimi.

**Fermentazione:** la fermentazione è forse la più antica biotecnologia conosciuta utilizzata dall'uomo. Essa consiste nell'attività di alcuni microrganismi che metabolizzano gli zuccheri monomerici producendo etanolo e anidride carbonica.

Per essere economicamente sostenibile, la produzione di etanolo da idrolizzati lignocellulosici richiede microrganismi efficienti che sopportino bene potenziali inibitori. Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è molto resistente a molte sostanze "tossiche" (incluso lo stesso prodotto della reazione, l'etanolo). I microrganismi tradizionali utilizzati per la fermentazione dell'etanolo (*S. cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*) non sono in grado di metabolizzare gli zuccheri a 5 atomi di carbonio (zuccheri pentosi, come lo xilosio derivante dall'emicellulosa).

Sono stati identificati, dunque, batteri, lieviti e funghi, sia naturali che ricombinati, capaci di assimilare e fermentare lo xilosio e l'etanolo; tra questi alcuni lieviti come *Pachysolen tonnophilus* e *Phichia stipilis* agiscono con rese medio-alte, ma sono molto sensibili alla presenza degli inibitori, a concentrazioni di etanolo superiori al 3% e richiedono condizioni microaerofile per la fermentazione. Le condizioni di microaerofilia sono molto difficili da ottenere tecnologicamente e, di conseguenza, non possono essere sfruttate.



Per questo motivo, negli ultimi anni, vi è un forte interesse verso quelle tecniche in grado di produrre microrganismi ingegnerizzati più “robusti” ed in grado di fermentare zuccheri pentosi ed esosi contemporaneamente.

Le modifiche genetiche sono indispensabili per ampliare il ventaglio di substrati metabolizzabili da un singolo organismo, rendendo possibile la co-fermentazione di zuccheri pentosi ed esosi: la strategia prevede di inserire geni per la via metabolica dello xilosio in un organismo che in natura predilige il glucosio, come ad esempio *S. cerevisiae*.

L’etanolo è esso stesso fonte di tossicità per i lieviti, anche per quelli fermentatori. Ovviamente, sulla scala delle tossicità, ci sono sostanze più dannose tra cui FUR e HMF. La tossicità, però, è sempre un effetto combinato: in presenza degli inibitori, l’etanolo è tossico a concentrazioni molto più basse (1%--2% invece che 8%--10%) per cui non si riesce ad ottenere il prodotto desiderato e il tempo di fermentazione aumenta considerevolmente. Questa condizione di fermentazione fa sì che, per un processo di alimentazione in cui la materia di alimentazione e il volume del reattore sono fissati, non si riesca a terminare la fermentazione.

Per risolvere questo problema sono stati uniti i processi di saccarificazione e fermentazione così da consumare immediatamente gli zuccheri prodotti.

Per ottenere un’alta produzione di etanolo serve molto zucchero e, di conseguenza, molta cellulosa (>30%). Questa concentrazione così elevata di cellulosa causa viscosità: i biopolimeri a base di zucchero, in alto rapporto solido-liquido, tendono a fissare acqua quando passano in stato amorfo. Avere un’alta concentrazione di etanolo, però, significa spendere meno per distillarlo: se si ottiene una concentrazione di etanolo al 4%, si avrà 4 parti di etanolo e 96 parti di acqua che corrisponde a 24 volumi di acqua da separare per distillazione per ogni volume di etanolo ottenuto. Se si ottiene una concentrazione di etanolo dell’8%, si avrà 8 parti di etanolo e 92 parti di acqua, corrispondenti a 11,5 volumi di acqua da separare per distillazione per ogni volume di etanolo ottenuto, cioè il 48% in meno di acqua.

Una soluzione per ovviare alle alte concentrazioni di etanolo, senza diminuire la quantità di cellulosa presente, è quella di lavorare in Fed-batch: in pratica si immette gradualmente il materiale nel reattore riducendo la concentrazione di cellulosa, ma ottenendo comunque le quantità di etanolo desiderate.

**Separazione dell'etanolo:** normalmente l'etanolo viene purificato all'azeotropo, cioè al 95%. L'etanolo come tale, però, non può essere utilizzato nei motori poiché si formano una serie di composti durante la combustione che andrebbero a danneggiare il motore stesso. Per essere utilizzato nei motori, deve essere ulteriormente purificato ad etanolo assoluto altrimenti non si riesce a miscelarlo al resto della benzina. Per questo motivo la distillazione è un processo molto oneroso.

Sono utilizzate principalmente due tecniche:

- Distillazione all'azeotropo e successiva distillazione azeotropica a pressione differente in modo da aumentare la purezza dell'etanolo sopra il 95%;
- Utilizzo di setacci molecolari per andare oltre l'azeotropo.

La soluzione concentrata di etanolo rende più economico il processo di separazione dell'etanolo stesso. Vi sono processi che rimuovono l'etanolo man mano che questo viene prodotto, ciò favorisce la fermentazione ma sfavorisce la separazione per distillazione.

Un metodo per ottimizzare la distillazione è l'utilizzo della termocompressione. Nella distillazione c'è bisogno di un compressore per condensare i vapori e, d'altra parte, di far bollire il contenuto della caldaia. Non si può prendere, però, il calore a bassa temperatura del condensatore per far bollire la caldaia senza aumentare la pressione dei vapori. Aumentando la pressione del vapore di testa lo si può condensare ad una temperatura più alta, temperatura sufficiente per far bollire il contenuto della caldaia e quindi produrre vapore. L'utilizzo della termocompressione ottimizza dal punto di vista energetico la separazione dell'etanolo.

### *2.2.1 Il pretrattamento: importanza e problematiche*

Lo scopo principale del pretrattamento è quello di abbattere la struttura della lignina e distruggere la struttura cristallina della cellulosa per incrementare l'accessibilità degli enzimi, migliorando la digeribilità della cellulosa (Mosier et al., 2005b).

Ogni pretrattamento ha un effetto specifico sulla frazione di cellulosa, emicellulosa e lignina; pertanto, è necessario scegliere i diversi metodi e le condizioni di pretrattamento in base alla configurazione del processo selezionata per le successive fasi di idrolisi e fermentazione.

I costi elevati sono il problema principale del processo di produzione di bioetanolo di seconda generazione. Il fattore più importante per ridurre questi costi è l'utilizzo efficiente della materia prima in modo da ottenere elevata produttività, alta concentrazione di etanolo nell'impianto di distillazione e anche l'integrazione dei processi al fine di ridurre la spesa energetica (Alvira et al., 2010).

L'obiettivo di idrolizzare la biomassa lignocellulosica in monosaccaridi fermentabili è ancora tecnicamente problematico, questo a causa della digeribilità della cellulosa che è ostacolata da molti fattori fisico-chimici, strutturali e compositivi.

Per queste caratteristiche strutturali, un idoneo pretrattamento è il passaggio cruciale per l'impatto sull'efficienza della bioconversione complessiva.

Oltre ad essere considerato un passaggio fondamentale nella conversione biologica dell'etanolo, il pretrattamento della biomassa rappresenta uno dei principali costi economici del processo. In effetti è stato descritto come il secondo costo unitario più dispendioso nella conversione della biomassa lignocellulosica basata sull'idrolisi enzimatica, preceduto soltanto dal costo delle materie prime.

Poiché differenti materiali lignocellulosici hanno differenti caratteristiche fisico-chimiche, è necessario adottare tecniche di pretrattamento opportune basate non solo sull'impatto che si riscontra sulle fasi successive del processo, ma anche sulla biomassa lignocellulosica utilizzata.

### **2.3 Il riutilizzo degli enzimi**

Gli enzimi sono molto costosi e non dovrebbero essere sprecati nell'idrolisi della lignina, questa infatti dovrebbe essere separata nella prima fase di reazione, il pretrattamento.

Come è stato accennato nella saccarificazione, gli enzimi cellulasi, dopo aver idrolizzato la cellulosa, si legano alla lignina che va spesso a finire in caldaia dove viene separata. Con questo processo si instaurano due problemi:

- Se vengono separati prima, la lignina porta via con sé gli enzimi
- Se vengono separati dopo, gli enzimi si denaturano a causa delle alte temperature.

Per ovviare a questo problema, si sta cercando di prelevare gli enzimi e riportarli al processo di saccarificazione enzimatica per riutilizzarli. Questo è possibile tramite l'utilizzo di membrane, ma risulta essere complicato poiché le membrane si sporcano molto facilmente

Questo procedimento può essere praticato in varie fasi: prima della fermentazione, tra la fermentazione e la distillazione, dopo la distillazione ma cambiando metodo di separazione dell'etanolo poiché la temperatura di distillazione è troppo alta (100°C) e gli enzimi si denaturano sopra i 60°C. Un metodo per separare gli enzimi a fine processo è quello di utilizzare una tecnica di distillazione differente, svolta a basse temperature per far sì che la temperatura all'interno della caldaia non aumenti troppo. Questi sono gli scenari per abbattere quello che è uno dei principali fattori di costo del processo di produzione dell'etanolo lignocellulosico.

### **2.4 Rese e bilancio energetico netto**

Le rese riguardanti il processo di conversione della biomassa lignocellulosica in etanolo dipendono da:

- a) disponibilità areali di risorse lignocellulosiche. Queste potrebbero essere scarti di prodotti agronomici come tralci di potatura;
- b) contenuto zuccherino del materiale lignocellulosico utilizzato;
- c) il tipo di trattamento idrolitico ha un effetto importante sulle rese;

- d) la presenza di inibitori, come composti tossici formati dai trattamenti a caldo, possono portare degli effetti tossici sui microrganismi e quindi diminuire la resa.

L'energia sostenibile è quel tipo di energia che si lega al concetto di sviluppo sostenibile, ossia quella forma di sviluppo economico che coinvolge anche la salvaguardia ambientale, per le generazioni future. Tale forma di produzione e consumo di energia riguarda anche l'efficienza degli usi energetici.

Il bilancio energetico netto serve per valutare quanto una risorsa rinnovabile sia sostenibile, esso viene calcolato tramite il rapporto tra l'energia ottenuta dalla combustione e l'energia spesa per ottenere quella combustione:

$NEB = \text{energia ottenuta dalla combustione} / \text{energia spesa}$ .

Quando il valore è pari a 1 il bilancio è in pareggio, mentre solo quando il valore è maggiore di 1 la risorsa è considerata sostenibile.

### **3. I SOLVENTI EUTETTICI E INVERTIBILI**

I solventi sono liquidi in grado di sciogliere altre sostanze (allo stato solido, liquido o gassoso) o estrarle, senza tuttavia subire alterazioni chimiche. Vengono utilizzati per frantumare, indebolire, sospendere qualsiasi sostanza o estrarre materiali diversi, di norma senza modificare chimicamente né nei solventi, né i materiali.

I solventi vengono utilizzati in quasi tutte le filiere produttive, dalla produzione di vernici alla produzione di prodotti farmaceutici.

Tra tutti i dissolvibili, l'acqua è senza dubbio il solvente più comune, economico e adatto dal punto di vista della sicurezza e della salute degli utilizzatori. La sua struttura molecolare, però, ne limita l'impiego (Davis, 2015).

#### **3.1 I solventi tradizionali**

Attualmente, i solventi di uso comune sono composti organici volatili (COV).

I COV possono provenire da fonti naturali (origine biogenica), da processi umani (origine antropogenica) o da entrambe le fonti.

I composti volatili di origine naturale derivano principalmente dai vegetali. Tra questi troviamo il metano (CH<sub>4</sub>), derivante da un processo di decomposizione anaerobica di substrati organici, i terpeni, appartenenti ad una classe di idrocarburi insaturi, e altre categorie di composti organici, quali esteri, aldeidi, chetoni, e perossidi.

I composti di origine antropica derivano principalmente da processi industriali di trasformazione e produzione. Un esempio sono gli idrocarburi alifatici, gli idrocarburi aromatici, le aldeidi e gli alcoli.

Questi solventi vengono, ormai, utilizzati in ogni settore industriale: dalla chimica farmaceutica alla produzione di gomme e vernici, ma hanno un impatto ambientale significativo.

In generale, ciascun inquinante dell'aria ha un tempo caratteristico di permanenza in atmosfera, legato alle sue proprietà chimico-fisiche. Tanto maggiore risulta essere

questo tempo, tanto più l'inquinante può disperdersi nell'atmosfera per opera dei venti e di correnti, alterando l'equilibrio chimico dell'atmosfera stessa.

Molti COV intervengono nell'equilibrio del metano (CH<sub>4</sub>), prolungando la sua permanenza nell'atmosfera e contribuendo così all'incremento dell'effetto serra.

È inoltre importante notare come molti COV siano pericolosi per gli uomini e gli animali:

- Il benzene è un composto cancerogeno caratterizzato da un'elevata volatilità;
- La formaldeide è un altro composto tossico prodotto in elevate quantità e comunemente impiegato in molti processi produttivi;
- I composti alogenati hanno elevate caratteristiche di volatilità e tossicità; inoltre, essendo tendenzialmente idrofobici, possono accumularsi nell'organismo.

Il fatto che i COV possano evaporare a temperatura ambiente li rende instabili, infiammabili e pericolosi per chi li utilizza.

La sostenibilità è uno degli aspetti che oggi giorno deve essere valutata quando viene attuato un processo industriale. Quando si applica un processo, bisogna analizzare sia gli aspetti che precedono la produzione, sia quelli che la seguono.

Riguardo le estrazioni con solvente, per valutare la sostenibilità del processo, bisogna considerare, per prima cosa, i componenti che lo costituiscono, la loro tossicità e il loro costo. Una volta avvenuto il processo, è necessario tener conto del possibile riutilizzo o, in caso di smaltimento, della difficoltà e dei costi ad esso legati.

I COV, di conseguenza, non sono solventi sostenibili. Sono tossici per l'uomo e inquinanti per l'ambiente, sono anche difficili da recuperare e smaltire.

A causa di questi problemi, negli ultimi anni si stanno sviluppando nuove classi di solventi che rientrano all'interno del concetto di *Green Chemistry*.

La *Green Chemistry* rappresenta una nuova concezione di chimica che si propone di reindirizzare l'industria chimica, su percorsi di eco-sostenibilità. Lo sviluppo sostenibile, divenuto sempre più centrale nel progresso scientifico e tecnologico nell'ultimo secolo, impone infatti alla chimica di giocare un ruolo primario nella progettazione di nuovi prodotti e nuovi processi che siano sempre più eco-compatibili.

### 3.2 I solventi eutettici

Negli ultimi anni sono stati sviluppati e sperimentati in diversi campi dei composti chiamati *deep eutetic solvent* (DES), che in italiano prendono il nome di solventi eutettici.

I DES, infatti, sono una classe emergente di miscele costituita da due o più composti ad una precisa concentrazione molare che conferisce la più bassa temperatura di fusione possibile rispetto alle sostanze di partenza o rispetto alle altre miscele ottenute con rapporti di concentrazione differenti (Fig.2). Questo perché normalmente il salto di temperatura non è particolarmente pronunciato, ma quando i legami tra le sostanze che costituiscono il solvente eutettico sono molto forti, l'abbassamento di temperatura può essere molto rilevante. Da questo l'aggettivo "*deep*", che indica il basso punto di fusione alla formazione di legami idrogeno. Uno dei parametri che caratterizza queste miscele eutettiche è chiamato distanza eutettica (Fig. 2), che è la differenza tra il punto di fusione della miscela e la retta che congiunge i punti di fusione dei diversi composti (Sekharan et al., 2022).

È molto interessante che tra queste sostanze che vanno a comporre i DES ci siano anche composti che presi singolarmente sarebbero addirittura solidi, ma messi in miscela possono formare liquidi, quindi dei solventi.



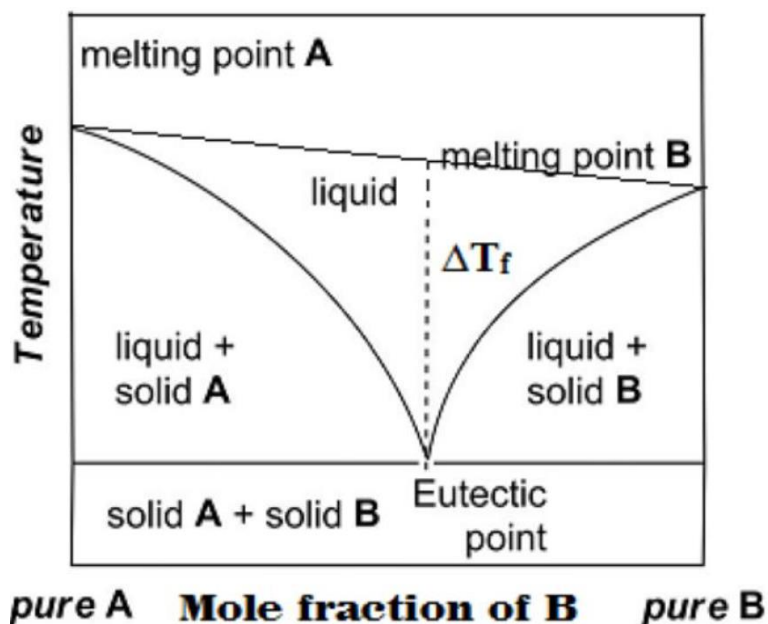


Fig. 2 Formazione di una miscela eutettica tra due composti solidi A e B.  $\Delta T_f$  corrisponde alla distanza (Sekharan et al., 2022).

Uno dei primi DES che è stato formato (Fig. 3) è composto da cloruro di colina e urea a 303 K. Il più basso punto di fusione osservato per questa miscela binaria si verifica con un rapporto 1:2 e a 12°C, che lo rende, a temperatura ambiente, un liquido (Hansen et al., 2020).

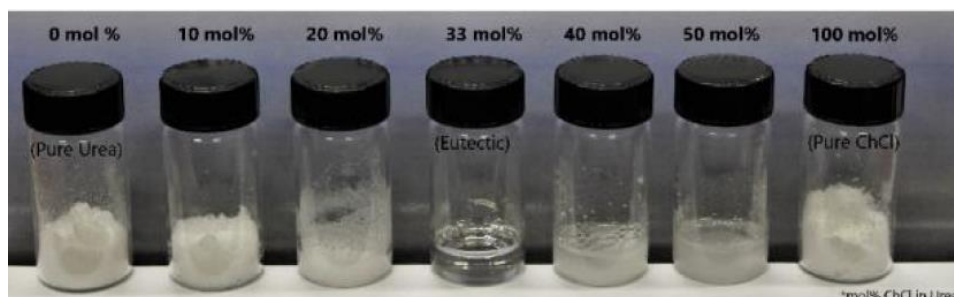


Fig. 3 mol % ChCl, da sinistra a destra -0, 10, 20, 33, 40, 50 100 (Hansen et al., 2020)

Il cloruro di colina (ChCl), un sale quaternario di ammonio, ha la funzione di accettore di legami idrogeno (HBA, *hydrogen bond acceptor*) ovvero un composto ionico in grado di poter accettare uno ione idrogeno grazie alla presenza nella molecola di un gruppo funzionale carico negativamente (in questo caso uno ione Cl<sup>-</sup>) mentre la

funzione di donatore di legami idrogeno (HBD, *hydrogen bond donor*) è svolta dall'urea. (Si forma una struttura supramolecolare come quella delle proteine).

Successivamente sono stati creati numerosi DES basati sul cloruro di colina e altri composti utilizzati come donatori di elettroni ad esempio alcoli, acidi e chetoni.

Grazie a queste proprietà, possono essere prodotte in modo economico nuove miscele eutettiche che possono essere utilizzate come solventi o elettroliti.

La maggior parte dei DES che sono stati preparati e studiati finora sono tradizionalmente classificati come tipo I, cioè ottenuti dalla combinazione di un sale di ammonio quaternario e un cloruro di metallo.

Esistono altre tipologie di solventi eutettici:

- Tipo II: costituito da un sale di ammonio quaternario e un cloruro di metallo idrato;
- Tipo III: costituito da un sale di ammonio quaternario e un HBD (tipicamente un componente molecolare organico come un'ammide o un acido carbossilico);
- Tipo IV: costituito da un cloruro di metallo idrato e un HBD
- Tipo V: sono una classe relativamente nuova costituita soltanto da HBA e HBD non ionici, cioè molecole che non presentano una carica netta. Anche se manca il contributo ionico, tuttavia mostrano ancora le caratteristiche relative al punto di fusione dei DES. Si ritiene, perciò, che il legame a idrogeno sia particolarmente prevalente in queste miscele eutettiche. Le miscele così composte sono caratterizzate da una bassa conduttività elettrica (Hansen et al., 2020).

### *3.2.1 I metodi di preparazione dei solventi eutettici*

La preparazione dei DES è molto semplice e si basa soprattutto sulle preferenze dell'operatore, sui macchinari a disposizione e sulla capacità di riuscire a diminuire il contenuto di acqua.

Il metodo di preparazione più comunemente utilizzato prevede di riscaldare e mescolare insieme i costituenti del DES in atmosfera inerte fino ad ottenere la formazione di un liquido omogeneo. Non è necessario nessun solvente aggiuntivo e, di conseguenza, non sono necessarie fasi di purificazione, questo le rende valide soluzioni ai solventi organici convenzionali e ai liquidi ionici.

Altri metodi di separazione dei DES includono l'evaporazione sottovuoto, la macinazione e la liofilizzazione:

- Nel metodo di evaporazione, i componenti vengono disciolti in acqua, dopodiché la maggior parte dell'acqua viene evaporata a 323K sottovuoto. La miscela finale viene conservata all'interno di un essiccatore con gel di silice fino a raggiungere un peso costante.
- Nel metodo di macinazione, i due componenti solidi vengono addizionati all'interno di un mortaio dove vengono macinati fino a formare un liquido limpido e omogeneo. Questo processo viene effettuato in atmosfera inerte.
- Nel metodo di liofilizzazione, sia l'HBD che l'HBA vengono disciolti in circa il 5% in peso d'acqua. Queste due soluzioni vengono miscelate, congelate e successivamente liofilizzate per formare un liquido limpido e omogeneo (Gutiérrez et al., 2009).

### *3.2.2 I solventi eutettici naturali*

Una sottoclasse dei DES sono i solventi eutettici composti da sostanze di origine naturale. Questi solventi eutettici, che sono caratterizzati da una miscela composta da una molecola in grado di fare da donatore di elettroni e una in grado di fare da accettore di elettroni stabilendo legami, creano un'accoppiata che di per sé è come se fosse una "supermolecola". I legami a idrogeno che si instaurano, formano una struttura supramolecolare che conferisce al solvente delle specifiche caratteristiche.

L'origine dei DES può essere di sintesi, ma c'è un grandissimo interesse anche nell'utilizzo di sostanze che abbiano queste peculiarità e che siano, all'origine, sostanze naturali, quindi metaboliti prodotti dalle naturali vie biosintetiche.

Quasi tutte le sostanze naturali sono in grado di costituire, in miscele e in rapporti opportuni, gli eutettici profondi. Siccome sono composti formati totalmente da sostanze naturali, è stato coniato un neologismo per indicare questi solventi, che sono sempre dei DES, e vengono chiamati NaDES (*natural eutetic solvents*).

I NaDES sono contraddistinti dalle seguenti proprietà:

- Non tossici;
- Biodegradabili;
- Facili da reperire e preparare;
- A basso costo (poiché sono abbondanti in natura).

I NaDES Sono solventi innovativi che hanno una serie di interessanti potenzialità sia dal punto di vista della capacità estrattiva che dal punto di vista della rispondenza ai criteri di sostenibilità.

Siccome le sostanze che possono dare origine a questi solventi eutettici naturali sono centinaia e siccome l'argomento è molto recente, lo spettro di sostanze utilizzabili è stato soltanto parzialmente esplorato. Possono essere zuccheri, acidi organici, aminoacidi, alcoli ma normalmente le sostanze incluse in questi solventi sono poco volatili poiché lavorano esclusivamente in fase liquida.

La maggior parte di questi composti ha caratteristiche di tipo idrofilico; quindi, si riescono a miscelare bene o molto bene con l'acqua. Questo vuol dire che l'acqua può diventare un possibile terzo componente.

Se l'acqua viene utilizzata come terzo componente del NaDES, questa fa variare due proprietà:

- Viscosità, che diminuisce dato che l'acqua è molto fluida;
- Polarità, che diminuisce poiché spesso l'acqua è più polare di alcune di queste combinazioni.

Se si aggiunge, nella composizione del NaDES, acqua per una quantità maggiore del 50%, si perde la caratteristica del solvente eutettico. Le due sostanze messe assieme hanno la caratteristica di formare il solvente eutettico profondo, come se fosse una terza sostanza con caratteristiche differenti da quelle dei due componenti di partenza. Se a questa miscela eutettica si aggiunge acqua in quantità moderata, le caratteristiche cambiano di poco, se si addiziona molta acqua, succede che questa non funge più da terzo componente, restando un NaDES, ma quello che accade è che le due sostanze, che si erano apparentate formando un legame supramolecolare, finiscono per sganciarsi l'una dall'altra e diventare semplicemente due soluti in acqua. Scompare la caratteristica di avere un punto di fusione molto più basso rispetto a quello delle due sostanze di partenza.

I NaDES sono stati inventati meno di dieci anni fa, ma studi riguardanti sostanze con questo carattere sono stati pubblicati nei primi anni 2000. Nel corso delle indagini è stato trovato che la struttura supramolecolare, che si crea tra metaboliti diversi che scambiano legami idrogeno, è una forma che la natura stessa usa per ragioni di sopravvivenza. Può essere un modo per le piante di evitare le problematiche di siccità, essiccamento e congelamento. In assenza di acqua, il NaDES ha una temperatura di solidificazione più bassa di quella che presenta in presenza di acqua. Questo può consentire alla pianta la gestione dell'acqua nelle varie situazioni di carenza o di solidificazione quando le temperature sono molto basse.

In Natura, i NaDES diventano lo strumento con il quale veicolare sostanze con diverso carattere a prescindere dal fatto che l'acqua, che sarebbe il solvente naturale per eccellenza, non sarebbe adatta a veicolarle tutte. Ci sono sostanze idrofiliche che si disciolgono facilmente in acqua e che possono essere trasportate, ma ci sono sostanze fortemente idrofobiche che in acqua non si disciolgono e sarebbero difficili da veicolare all'interno degli organismi o della cellula.

La formazione di una sostanza a carattere liquido sufficientemente fluida, da poter permettere la diffusione di molecole da un posto all'altro di un organismo o di una

cellula, diventa uno strumento fondamentale per l'esistenza e la funzionalità degli organismi viventi.

I NaDES hanno uno spettro di solubilità molto ampio grazie alla loro capacità di essere formulati e riformulati in modo diverso per adattarsi a sostanze diverse e ciò fa in modo che finiscano per essere un luogo adatto per le reazioni enzimatiche, per lo stoccaggio e il mezzo adatto per il trasporto di molecole bioattive.

Due delle caratteristiche dei NaDES sono:

- La capacità di preservare il potere antiossidante;
- L'abilità di mantenere invariata la conformazione.

Le proteine hanno un valore biologico che dipende dalla loro conformazione e, nel momento in cui la conformazione viene persa, di norma una parte del valore biologico può essere perduto. Se la proteina ha una funzione di carattere enzimatico, l'attività enzimatica può essere persa. Questa capacità del NaDES di rallentare i meccanismi degradativi offre una protezione alla struttura biologica complessa che ha una funzione di bioattività.

I DES non sono volatili a temperatura ambiente, sono chimicamente e termicamente stabili, non sono infiammabili e hanno grandi proprietà di dissoluzione per diversi composti organici.

I solventi volatili hanno la capacità di essere evaporati ed allontanati dal soluto estratto, la non volatilità dei DES li rende poco adatti per il recupero quantitativo dei prodotti di reazione o dei componenti estratti. Non essendo possibile eliminarli per evaporazione (se non in condizioni di vuoto spinto e/o alte temperature), aumenta significativamente la complessità ed il costo della separazione. Nei casi migliori è possibile isolare il prodotto abbassandone la solubilità nel solvente eutettico per semplice aggiunta di acqua e recuperano quindi per precipitazione. In altri casi è possibile recuperare alcuni prodotti idrofobici attraverso reazioni liquido-liquido con solventi organici immiscibili nei solventi eutettici, riproponendo però i problemi legati all'ambiente e alla salute (Dai et al., 2013).

In questi casi il recupero dal DES causa una sensibile riduzione della resa, questo probabilmente a causa della forte rete di legami idrogeno tra i componenti del DES e i soluti. È quindi fondamentale continuare la ricerca al fine di sviluppare metodi alternativi per il recupero efficace, sicuro e poco costoso dei composti disciolti.

### **3.3 I solventi invertibili**

Lo scopo di eseguire più passaggi utilizzando la quantità minima di solventi è uno dei concetti fondamentali della *Green Chemistry*, considerato una delle sfide chiave che non potevano essere raggiunte fino a tempi recenti (Alshana et al., 2020).

Il più grande ostacolo per lo sviluppo di processi e separazioni chimiche verdi è l'utilizzo di solventi specifici per fasi specifiche. Reagenti, catalizzatori e prodotti hanno spesso una solubilità diversa, il che significa che è necessario un solvente differente per solubilizzare ogni componente di un processo chimico. Questo è altamente dispendioso e spesso aumenta notevolmente il costo di elaborazione.

La risposta convenzionale per rendere più ecologici i processi chimici è ridurre gli sprechi attraverso il riciclaggio, ma questo non risolve il problema fondamentale: l'utilizzo di solventi specifici per una specifica applicazione.

Aumentare l'efficienza dei processi chimici è un ottimo modo per ridurre l'impatto ambientale. Una strategia per aumentare l'efficienza è l'uso di materiali commutabili o "intelligenti", che possono essere cambiati in modo reversibile da una forma all'altra. Tale commutazione, comporta che il materiale può svolgere due ruoli nel processo o può essere facilmente separato da altri materiali.

La maggiore flessibilità dei materiali commutabili rappresenta una nuova strategia per ridurre al minimo il consumo di energia e materiale nei processi di estrazione.

I solventi invertibili hanno questo nome perché possono modificare una qualche proprietà che ha una caratteristica importante nei riguardi della separazione. Può trattarsi, nei solventi utilizzati per motivi di estrazione, di una proprietà riguardante la variazione della solubilità.

Questa tipologia di solventi può essere modificata in situ in modo reversibile tramite l'applicazione di uno stimolo esterno denominato "trigger". Questo stimolo esterno può modificare:

- La polarità, il solvente da polare diventa apolare e viceversa e prende il nome di solvente a polarità invertibile, *switchable polarity solvent* (SPS).
- L'idrofilicità, un solvente idrofobo può diventare idrofilico e successivamente tornare idrofobico attraverso la rimozione dello stimolo. Si parla di solventi ad idrofilicità invertibile, *switchable hydrophilic solvents* (SHS).

L'impiego della CO<sub>2</sub> di scarto come fattore scatenante, rispetto ad altri *trigger* come luce, acidi e ossidanti, per il passaggio da una forma all'altra, non è solo una scelta rispettosa dell'ambiente riguardo alla maggior parte delle alternative, ma ha anche il vantaggio di essere poco costosa, non pericolosa, non si accumula nel sistema e può essere facilmente rimossa dal materiale. Inneschi chimici come acidi od ossidati sono generalmente indesiderabili perché devono essere utilizzati in quantità stechiometriche, si accumulano nel sistema dopo ogni ciclo di commutazione ma anche per il costo ambientale ed economico della loro produzione e smaltimento (Jessop et al., 2012).

### 3.3.1 *Switchable polarity solvents* (SPS)

I solventi commutabili, ovvero liquidi che possono essere cambiati in modo reversibile da una forma all'altra, sono stati pensati per essere soluzioni al pratico enigma chiamato "Legge di Murphy dei solventi", dove si afferma che "il miglior solvente per qualsiasi fase del processo è dannoso per la fase successiva". Sono stati progettati solventi in grado di rispondere alle esigenze di una fase del processo e che quindi possono essere modificati in situ per soddisfare le esigenze della fase successiva. Questo diventa indispensabile per riuscire ad utilizzare un unico solvente in fasi di processo differenti.



I solventi commutabili che utilizzavano la CO<sub>2</sub> come stimolo sono stati inventati dal gruppo Jessop (Jessop et al., 2005) e sviluppati assieme ai Drs. Eckert e Liotta della Georgia Tech (Phan, Chiu, et al., 2008) sono solventi a polarità invertibile (SPS) e passano da una forma a bassa polarità ad una forma ad alta polarità (fig. 4). L'innesco chimico per il cambio di polarità era causato da 1bar di CO<sub>2</sub>.

La reazione è facilmente reversibile mediante rimozione della CO<sub>2</sub>, che si ottiene riscaldando la soluzione (generalmente a 50°C) e/o facendo gorgogliare un gas non acido come N<sub>2</sub> attraverso la soluzione per un'ora. L'inversione è semplice non solo poiché la CO<sub>2</sub> è un gas, ma anche perché la termodinamica della reazione è approssimativamente bilanciata.

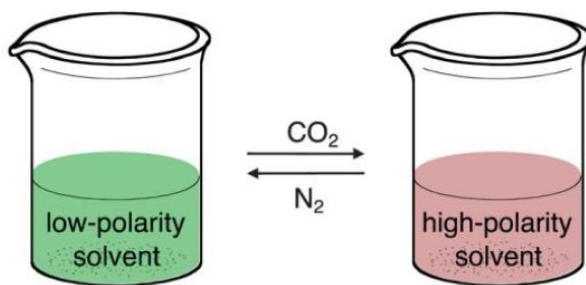


Fig. 4 Solventi a polarità invertibile. Questi solventi hanno una bassa polarità finché non vengono esposti a 1bar di CO<sub>2</sub>, trasformando in liquidi ionici ad alta polarità (Jessop et al., 2012)

I sistemi SPS più economici possono essere realizzati con un solo componente organico e senza le costose basi di amidina e guanidina. I primi SPS monocomponenti erano le ammine secondarie. Non c'era bisogno di una base amidina o guanidina perché l'ammina è contemporaneamente sia un nucleofilo che il donatore di protoni. Pertanto, i carbammati derivati dalla reazione di CO<sub>2</sub> e un'ammina secondaria possono fungere da SPS monocomponente (Phan, Andreatta, et al., 2008).

### 3.3.2 *Switchable hydrophilic solvents (SHS)*

La distillazione è una strategia molto utilizzata ma costosa, sia dal punto di vista ambientale che economico, a causa dell'elevata spesa energetica. È un processo con un impatto ambientale significativo a causa dell'energia richiesta per la separazione del solvente dal prodotto, ma anche perché richiede l'impiego di un solvente volatile. Gli svantaggi nell'utilizzo di un solvente volatile includono infiammabilità, emissioni di vapore, formazione di smog e impatto sulla salute quando vengono inalati. Questi svantaggi possono essere evitati utilizzando invece solventi non volatili, se è possibile trovare un metodo senza distillazione per rimuovere i solventi non volatili dai prodotti.

La non volatilità dei NaDES, che impedisce di ricorrere alle tecniche di recupero dei soluti consolidate, ha limitato fino ad ora un ampio ricorso a questa nuova classe di solventi. Con l'introduzione del concetto di solvente modificabile in situ, è nato un nuovo approccio per il recupero del soluto in fase condensata e sono derivate, dunque, nuove tecniche.

La capacità del solvente di cambiare carattere dopo la dissoluzione del soluto viene utilizzata per ridurre la solubilità dopo l'estrazione, provocando così la separazione del soluto dal solvente e consentendone il recupero.

I solventi ad idrofilicità invertibile possono essere la soluzione. I SHS sono solventi liquidi che normalmente sono idrofobici da avere pochissima miscibilità con l'acqua e quindi formano una miscela bifasica quando miscelati con essa. Tuttavia, se esposti alla CO<sub>2</sub>, che è il trigger, questi solventi diventano molto idrofilici e completamente miscibili con l'acqua (fig. 5). Tali solventi possono comportarsi come l'esano (COV), ma essere facilmente rimossi mediante aggiunta di CO<sub>2</sub> e acqua senza l'utilizzo della tecnica di distillazione.

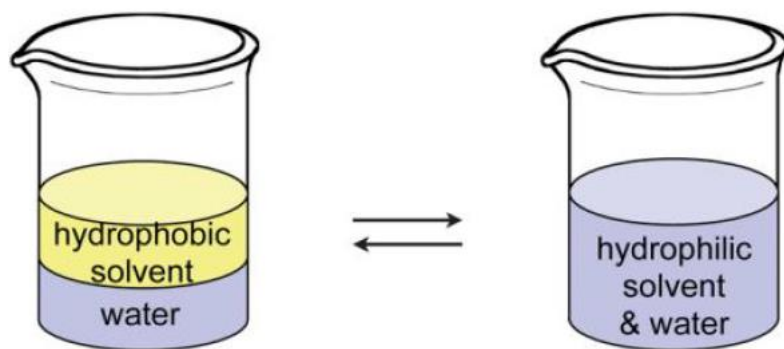


Fig. 5 Comportamento di fase dei solventi ad idrofilicità invertibile (Jessop et al., 2012)

Per ritornare alla fase iniziale, la CO<sub>2</sub> viene rimossa facendo gorgogliare N<sub>2</sub> attraverso la soluzione. In questo modo il SHS non è più miscibile con l'acqua e si forma nuovamente il sistema bifasico.

Per comprendere l'utilità di un SHS bisogna considerare il problema generale della separazione di un prodotto da un solvente. Dopo un'estrazione si ottiene una soluzione composta dal solvente e dai prodotti. Gli approcci tradizionali per separare il prodotto dal solvente includono la distillazione (che è meglio non utilizzare, come spiegato prima) o la precipitazione mediante l'aggiunta di un anti-solvente (che crea una maggiore quantità di rifiuti che devono quindi essere distillati per separare i solventi prima che possano essere riciclati).

Tuttavia, se il solvente è un SHS nella sua forma idrofobica, questo può essere rimosso dal prodotto mediante estrazione con acqua e CO<sub>2</sub> e successivamente recuperato dall'acqua, il tutto senza alcuna fase di distillazione (Fig. 6). Non è quindi necessario che il solvente sia volatile.

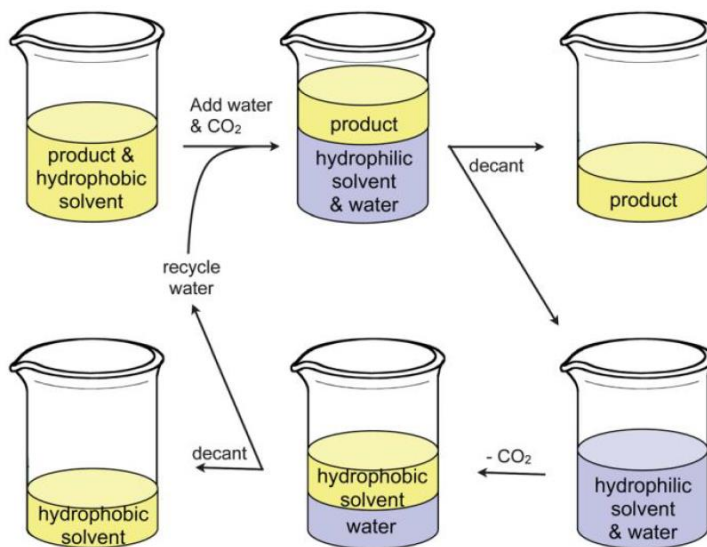


Fig. 6 Il processo mediante il quale un SHS può essere separato da un prodotto e recuperato senza una fase di distillazione. Sia il solvente che la fase acquosa potrebbero essere facilmente riutilizzati (Jessop et al., 2012).

Normalmente si applica l'estrazione dei soluti tramite un solvente idrofobico, quando questo diventa idrofilico si separa senza bisogno dell'evaporazione e della seguente condensazione. Tutta questa parte del "ritorno all'origine", cioè far ritornare il solvente da idrofilico ad idrofobico, risulta sprecata.

Si può pensare di fare una seconda estrazione dopo aver effettuato il cambio di idrofilicità in modo da poter sfruttare un solvente idrofilico. Quest'ultimo si comporta come un secondo solvente, ha ancora delle caratteristiche che lo rendono simile al solvente originario, ma è diventato capace di sciogliere sostanze che sono idrofiliche.

A questo punto, dopo l'estrazione in condizioni idrofiliche, si applica calore estraendo la frazione idrofilica con l'acqua.

Un esempio di SHS è la dimetilcicloesilammina (DMCHA), un prodotto con caratteristiche invertibili molto spiccate. A contatto con i microrganismi si comporta come l'esano, ma avendo anche un pH molto alto, riesce a rompere le cellule, processo sempre necessario per le biomasse cellulari vegetali. Permette, quindi, di evitare un pretrattamento.

Aggiungendo, successivamente, acqua e CO<sub>2</sub> si ottiene un sistema bifasico poiché il solvente diventa idrofilico. I composti polari ottenuti si separano perché non riescono più a rimanere in soluzione e si può estrarre la frazione lipidica.

A seguire, si può svolgere l'estrazione in condizioni idrofiliche trattando la parte di solido che non è stata disciolta nella prima reazione. Si può ritornare alla soluzione di partenza

rimuovendo il *trigger* riottenendo così la DMCHA e una fase acquosa dove sono contenuti i prodotti della seconda estrazione (proteine e carboidrati) (Jessop et al., 2012).

## **4. IL PRETRATTAMENTO DEI LIGNOCELLULOSICI MEDIANTE SOLVENTI EUTETTICI**

Nel processo di conversione della biomassa lignocellulosica in etanolo, come si accennava nel capitolo 1, il pretrattamento è un passaggio cruciale per ottenere un potenziale di zuccheri fermentabili nella fase di idrolisi.

Lo scopo del pretrattamento è quello di abbattere la struttura della lignina e distruggere la struttura cristallina della cellulosa per migliorare l'accessibilità degli enzimi durante la fase di idrolisi enzimatica.

L'attuale ricerca sul pretrattamento si concentra sull'identificazione, la valutazione, lo sviluppo e la dimostrazione di approcci promettenti che favoriscano principalmente la successiva idrolisi enzimatica della biomassa. Quest'ultima viene trattata con dosaggi enzimatici inferiori e una bioconversione più breve diminuendo i costi energetici del pretrattamento.

Poiché differenti materiali lignocellulosici hanno diverse caratteristiche fisico-chimiche, è necessario adottare tecnologie di pretrattamento opportune basate sulla biomassa lignocellulosica da trattare.

Diversi pretrattamenti hanno dimostrato di essere più adatti a materie prime specifiche. Quelli a base alcalina (come, a titolo di esempio la tecnica che utilizza la calce o quella basata sull'esplosione di fibre di ammoniaca, detta AFEX) possono ridurre efficacemente il contenuto di lignina nei residui agricoli, ma sono meno efficaci nella lavorazione di substrati recalcitranti come le conifere (Chandra et al., 2007).

I pretrattamenti a base acida, invece, si sono dimostrati soddisfacenti su un'ampia gamma di substrati lignocellulosici, ma sono costosi (Mosier et al., 2005).

Le diverse metodologie di pretrattamento per la conversione della biomassa si suddividono in fisiche (macinazione e raffinazione), chimiche (alcalino, acido, liquido

ionico, solvente eutettico profondo) e termodinamiche (AFEX, esplosione di CO<sub>2</sub>) e miste.

Il trattamento termodinamico può essere effettuato con diverse metodologie, due di queste sono: *steam explosion* o *vapour explosion* con ammoniaca.

- *Steam explosion*: è un trattamento per il quale si prende del materiale lignocellulosico, lo si mette in un recipiente chiuso, lo si espone a del vapore ad alta temperatura (200-220°C), dopodiché si apre la valvola improvvisamente. In questo modo il vapore va ad impregnare la matrice lignocellulosica che aumenta di temperatura e pressione anche internamente. Quando rilascio la pressione aprendo la valvola, il vapore si espande ed essendo presente anche dentro la matrice, tutta l'acqua che si è formata dentro di essa vaporizza improvvisamente andando a destrutturare il materiale rompendolo dall'interno.
- *Vapour explosion con ammoniaca*: si può porre il materiale dentro un reattore ad alta pressione e alta temperatura assieme all'ammoniaca. Anche in questo procedimento, quando la valvola viene aperta, la pressione si abbassa repentinamente e il materiale si sfibra.

La differenza tra i due processi appena elencati sta nel fatto che l'ammoniaca è un reagente di tipo alcalino e quindi svolgere il trattamento di esplosione con ammoniaca è come applicare due trattamenti contemporaneamente: uno di esplosione dall'interno e uno di tipo alcalino.

Si potrebbe pensare che la *steam explosion* provochi solo un trattamento dall'interno. Invece, con questo processo, l'ambiente diventa particolarmente acido; quindi, utilizzare questa metodologia permette di ottenere un'esplosione dall'interno di tipo moderatamente acido.

Un pretrattamento efficiente deve distruggere la struttura supramolecolare e modificare il legame tra i carboidrati e la matrice di lignina.

I pretrattamenti convenzionali sono suddivisi in metodi alcalini o acidi (spiegati nel primo capitolo); tuttavia, i difetti di queste metodologie sono evidenti:

- La corrosione delle apparecchiature;
- Il costo elevato del trattamento delle acque reflue o del riciclo chimico (Rastogi & Shrivastava, 2017).

Recentemente, per diversi processi industriali tra cui il pretrattamento della biomassa, lo sviluppo verde e sostenibile ha avuto un' enfasi crescente.

Tra i tanti metodi di pre-lavorazione, i DES sono risultati solventi “*green*” con molti vantaggi per il trattamento della biomassa grazie alla facilità di preparazione, elevata purezza, bassa tossicità, al fatto che sono facilmente biodegradabili, ai bassi punti di fusione, all'elevata stabilità termica, alla bassa volatilità, infiammabilità e all'elevata stabilità dell'aria (Machado, 2012).

I DES sono stati utilizzati per la prima volta nel pretrattamento della biomassa nel 2012 (Francisco et al., 2012) e il lavoro svolto si è concentrato principalmente sulla grande capacità di pretrattamento per diversi tipi di biomassa (Tan et al., 2018).

Si è sperimentato che il DES ha la capacità di convertire la biomassa in zuccheri riduttori dopo il pretrattamento. Pertanto, il pretrattamento DES è stato considerato uno dei metodi alternativi più promettenti in considerazione delle sue eccezionali prestazioni.

Per capire l'efficacia del pretrattamento mediante DES, questo è stato analizzato sulla base di tre diversi punti chiave:

- I materiali che compongono la biomassa grezza;
- Le proprietà del DES;
- Le variabili delle condizioni di pretrattamento.

Nel pretrattamento della biomassa lignocellulosica, sia le proprietà della materia prima che le variabili di processo hanno svolto un ruolo importante riguardo l'efficienza finale e la resa in zuccheri riduttori nel processo a valle di idrolisi.



## 4.1 Caratteristiche della materia prima da biomassa

Per lo studio del pretrattamento con DES sono state utilizzate un gran numero di biomasse differenti con diversi contenuti di componenti.

La caratterizzazione della materia prima e delle specie di biomassa grezza sono state considerate una variabile chiave per i risultati del processo di pretrattamento, è stato riscontrato che l'effetto del pretrattamento DES ha una stretta relazione con la tipologia di biomassa grezza (Chen et al., 2019).

Come detto sopra, la biomassa lignocellulosica è composta dai seguenti componenti: un polisaccaride cristallino (cellulosa), un polisaccaride amorfo (emicellulosa) e lignina.

Le aree cristalline della cellulosa possono influenzare in modo significativamente negativo l'idrolisi enzimatica dopo il pretrattamento, mentre l'emicellulosa, che ha struttura amorfa, viene facilmente idrolizzata da enzimi specifici per l'idrolisi acida.

La lignina è considerata il componente necessario da rimuovere poiché potrebbe:

- Contrastare l'idrolisi enzimatica della biomassa lignocellulosica (per la sua capacità di depositarsi sulle fibre di cellulosa, soprattutto in condizioni acide, rendendole meno accessibili);
- Limitare il rigonfiamento delle fibre;
- Fissare gli enzimi sottraendoli alla superficie adsorbente target.

La fase di pretrattamento è determinante per l'intero processo per la sua capacità di migliorare l'accessibilità e la reattività dei polisaccaridi distruggendo la struttura tridimensionale della lignocellulosa e rimuovendo sufficientemente la lignina senza degradare significativamente i polisaccaridi.

L'efficace pretrattamento DES si basa sulla sua capacità di dissociazione i legami carbonio-carbonio ed etere all'interno delle strutture della biomassa (Xia et al., 2018). L'efficienza di dissoluzione dei tre componenti (cellulosa, emicellulosa e lignina) nel sistema DES è significativamente diversa. La solubilità in cellulosa del DES è generalmente molto scarsa, mentre, rispetto ai carboidrati, la lignina può essere disciolta facilmente (Kumar et al., 2016).

In generale, si è visto che la solubilità DES dell'emicellulosa è superiore a quella della cellulosa (che è correlata alla lunghezza della catena) e anche che l'emicellulosa, che ha natura amorfa, ha la catena più corta, il grado di polimerizzazione più piccolo e una struttura più ramificata.

Inoltre, la struttura dei tre componenti principali cambia durante il pretrattamento DES.

- Per la cellulosa, il trattamento DES può rigonfiare la catena lunga, ridurre parzialmente il grado di polimerizzazione, aumentare l'area di reazione effettiva e la porosità della struttura macromolecolare, il che potrebbe migliorare la reattività (Song et al., 2019).
- Per l'emicellulosa, la rimozione dello xilano da parte del DES dipende principalmente dalla rottura dei legami glicosidici (legami COC) per formare monosaccaridi.
- Per la lignina, i cambiamenti delle caratteristiche strutturali e le trasformazioni morfologiche della lignina estratta dal DES durante il pretrattamento sono diventati uno degli hotspot della ricerca, che potrebbe fornire una guida per la valorizzazione della lignina.

A temperature superiori a 120°C, la siringil-lignina potrebbe essere rimossa più facilmente della guaiacil lignina, mentre a temperature inferiori a 100°C, la guaiacil lignina potrebbe essere degradata selettivamente. La rottura dei legami potrebbe comportare un aumento della quantità di gruppo idrossil-fenolici nella lignina estratta tramite il pretrattamento.

I risultati riportati hanno mostrato che il pretrattamento con DES potrebbe non solo portare a cambiamenti significativi nella struttura della lignina, ma anche produrre nanoparticelle di lignina omogenee.

#### *4.1.1 Cristallinità della materia prima da biomassa*

Il confronto tra la cristallinità della materia prima e i campioni della biomassa pretrattata possono essere utilizzati per valutare le prestazioni di pretrattamento della biomassa lignocellulosica (Xu et al., 2019).

La cristallinità della cellulosa migliora la resistenza della biomassa alla degradazione biologica. L'effetto del pretrattamento sulla cristallinità della cellulosa è complesso. Molte ricerche hanno dimostrato che la riduzione della cristallinità della cellulosa genera una migliore conversione per la saccarificazione della biomassa lignocellulosica (Sorn et al., 2019).

È stato notato che i valori di cristallinità dei campioni di biomassa aumentano dopo il pretrattamento con DES, principalmente a causa del fatto che questo pretrattamento rimuove i componenti non cristallini come l'emicellulosa e la lignina, lasciando più cellulosa nel residuo solido della biomassa pretrattata.

Un diverso rapporto molare delle componenti che formano il DES può influenzare la cristallinità dei campioni di biomassa che residuano dopo il pretrattamento. Un esempio è il pretrattamento di una pannocchia di mais (Zhang et al., 2016). Nelle stesse condizioni di pretrattamento (90°C per 24h con rapporto liquido-solido di 20), la biomassa è stata trattata con un NaDES composto da ChCl e acido lattico in rapporto molare rispettivamente di 1:2, 1:5, 1:10. La cristallinità dei campioni pretrattati è scesa al 38,6%, 37,4% e 32,2 %. È chiaro che in questo studio 1:2 è il rapporto molare adatto di DES che può rimuovere più lignina, aumentando così la cristallinità del campione pretrattato.

Successivamente, si è svolto un secondo esperimento sempre con la stessa biomassa grezza (Procentese et al., 2015) per dimostrare che aumentando la temperatura di pretrattamento, si può ottenere un valore maggiore di cristallinità della biomassa.

La temperatura più alta, infatti, sarebbe favorevole alla degradazione dei carboidrati nella regione non cristallina e più regioni cristalline verrebbero conservate nei campioni pretrattati.

La cristallinità dei campioni di biomassa pretrattata è influenzata dalla rimozione della lignina, dalla degradazione dei polisaccaridi e dalla rottura dei legami idrogeno durante il pretrattamento.

La cristallinità della materia prima è direttamente correlata alla “severità” del pretrattamento.

La materia prima con una maggiore cristallinità può quindi aver bisogno di più condizioni di pretrattamento con DES “severe” e con DES che abbiano una maggiore capacità intrinseca (ossia, legata ai costituenti, verosimilmente per il tramite della loro polarità) di degradare la struttura della biomassa.

La cristallinità è un parametro chiave e strettamente correlato alla digeribilità da parte degli enzimi. Essa, a sua volta, deriva dall’accessibilità dei siti idrolitici della molecola. Più bassa è la cristallinità e più favorevole è la successiva idrolisi enzimatica.

La diminuzione della cristallinità può comportare un aumento della superficie accessibile e della porosità, che migliorano l’accessibilità alla cellulasi, aumentando quindi il tasso di conversione finale della cellulosa tramite l’idrolisi enzimatica.

#### *4.1.2 Dimensione delle particelle di materia prima da biomassa.*

La densità e la durezza della biomassa sono caratteristiche intrinseche che non possono essere modificate artificialmente. Tuttavia, la dimensione delle particelle di biomassa può essere modificata per rendere il trattamento più efficiente.

La riduzione del materiale grezzo migliora la densità e la digeribilità. Indubbiamente, le dimensioni ridotte delle particelle di biomassa grezza, che hanno un valore più elevato di area superficiale specifica, possono ottenere risultati migliori di bagnatura e penetrazione del solvente e di trasferimento di massa nel pretrattamento (Flores-Velázquez et al., 2020).

Riducendo la dimensione della biomassa grezza, il tasso di delignificazione aumenta. Anche il tasso di conversione della cellulosa in glucosio è più elevato.

Una dimensione particellare adeguata può aumentare significativamente l'efficienza del pretrattamento. Tuttavia, va notato che quanto più fini sono le particelle di biomassa, tanto maggiore è il consumo di energia.

La riduzione dimensionale della biomassa lignocellulosica è un passaggio necessario per la preparazione delle materie prime per il processo di bioraffineria che può aumentare la digeribilità della biomassa. Bisogna tenere conto che la dimensione delle particelle è un fattore molto importante per il recupero dei carboidrati nel pretrattamento, ma oltre all'elevato consumo energetico, dimensioni più piccole portano ad un'eccessiva degradazione dei carboidrati e dimensioni maggiori provocano una reazione incompleta (Simangunsong et al., 2020).

## **4.2 Caratteristiche del DES**

Durante il pretrattamento, il frazionamento dei componenti della biomassa dipende principalmente dalle proprietà fisico-chimiche del DES utilizzato. Il meccanismo di reazione tra DES e biomassa è correlato alla natura del DES, come proprietà di HBD e HBA e il loro rapporto molare.

### *4.2.1 Effetti delle caratteristiche dell'HBD sul pretrattamento*

La struttura di HBD e il rapporto molare tra HBA e HBD possono influenzare le proprietà fisico-chimiche durante il pretrattamento DES della biomassa lignocellulosica come: tensione superficiale, viscosità, punto di fusione, punti di congelamento, punto di ebollizione, polarità, acidità o alcalinità, conducibilità, densità, indice di rifrazione e solubilità.

Molti di questi parametri sono correlati tra loro e sono dipendenti dalla temperatura. Ogni proprietà riflette informazioni importanti sul DES.

Come spiegato precedentemente, durante il processo di pretrattamento, il distinto rapporto molare tra HBA e HBD nella formazione del DES porta a risultati di frazionamento diversi delle tre componenti della biomassa lignocellulosica.

I DES con diversi rapporti molari hanno diverse proprietà fisiche e chimiche, in particolare la forza dei legami idrogeno che si instaurano.

Pertanto c'è un gran numero di potenziali DES con possibili HBA e HBD con rapporti molari differenti che portano ad ottenere risultati di frazionamento della biomassa differenti.

È importante utilizzare un DES che abbia specifiche proprietà in base agli obiettivi di pretrattamento che si vogliono raggiungere scegliendo le molecole più appropriate come un HBD con rapporto molare adatto.

L'elevata viscosità del DES influisce negativamente sul processo di trasferimento di massa nel pretrattamento (Smink et al., 2019).

La conducibilità è un parametro utilizzato per descrivere la mobilità del flusso di ioni in una sostanza ed è correlato alla viscosità (Ren et al., 2016). Minore è la viscosità del DES, maggiore è la sua conducibilità.

I DES con densità e viscosità inferiori possono avere una migliore capacità di penetrare nella struttura della biomassa (New et al., 2019).

Il DES ChCl/acido lattico (1:1) che ha alta fluidità e proprietà viscosive basse può promuovere una maggiore dissoluzione del soluto rispetto a ChCl/acido citrico (1:1). La maggiore mobilità delle molecole di ChCl/acido lattico può aumentare l'interazione del soluto DES con la lignina, che porta ad un tasso di delignificazione più elevato (33,5% rispetto al 20,6% ottenuto con ChCl/acido citrico).

Diversi HBD hanno differenti strutture molecolari e gruppi funzionali.

Questi, possono avere diverse lunghezze della catena, diverso numero di gruppi idrossilici, gruppi carbonilici e gruppi amminici. Alcuni HBD sono lineari e saturi, altri sono ciclici con catene ramificate. Queste molecole HBD differiscono per acidità e polarità. Le proprietà di HBD influenzano la capacità di frazionamento della

biomassa con il DES. Questo ha la capacità di rompere selettivamente i legami eterei senza eliminare i legami carbonio carbonio. Questo è il meccanismo più importante che porta al processo di delignificazione. La scissione dei legami eterei può aiutare a estrarre la lignina dal corpo della struttura naturale della biomassa.

È stato studiato anche l'effetto della lunghezza della catena alchilica sulla velocità di rimozione della lignina. La velocità di rimozione della lignina è correlata al numero di gruppi carbossilici, cioè dipende dal fatto che l'HBD sia un acido monocarbossilico o dicarbossilico.

Per gli acidi monocarbossilici con catena alchilica più corta si è riscontrata una maggiore solubilità della lignina, mentre per gli acidi dicarbossilici, la tendenza è stata opposta (Suopajarvi et al., 2020).

I DES con elevata capacità di accettazione del legame idrogeno e un'elevata polarità, dissolvono più facilmente la lignina (Jessop et al., 2012). Ad esempio, secondo la teoria della dissoluzione di Hansen (H. Yu et al., 2011), un DES avente come HBD l'acido lattico ha valori dei parametri della soluzione più elevati rispetto al HBD costituito da glicerolo o l'HBD costituito da urea.

In sintesi, la scissione del legame catalizzata da protoni è uno dei principali meccanismi per un'efficace separazione della lignina dalla biomassa.

Quando l'acido carbossilico è utilizzato come HBD, il DES acido che si forma mostra grandi prestazioni nel pretrattamento. I protoni attivi forniti dall'acido carbossilico facilitano la reazione di scissione dei legami nella biomassa lignocellulosica, come legami eterei, glicosidici o legami lignina-carboidrati.

Quando viene utilizzata un'ammina come HBD, invece, il DES è basico. Il meccanismo di delignificazione di questa tipologia di DES consiste nella deprotonazione dei gruppi idrossilici fenolici nella lignina. Lo svantaggio principale è che i DES basici necessitano di un'elevata severità della reazione per il pretrattamento in termini di tempo e temperatura (Ong et al., 2019).

In generale, maggiori sono la polarità e l'acidità di HBD, più forte è il legame idrogeno che si instaura nella formazione del DES e migliore è l'efficienza del pretrattamento che si può ottenere.

#### *4.2.2 Effetto del rapporto molare HBA e HBD sul pretrattamento con DES*

È stato notato che con il cambio del rapporto molare tra HBA e HBD varia notevolmente il tasso di rimozione della lignina e la resa totale di zucchero dell'idrolisi enzimatica.

Prendendo in considerazione il DES formato da ChCl e acido lattico, l'entità di estrazione della lignina aumenta con un pretrattamento DES con rapporto molare più elevato tra acido lattico e lignina.

Per la paglia di frumento (Jablonský et al., 2015) quando il rapporto di ChCl/acido lattico cambia da 1:9 a 1:10, il tasso di delignificazione aumenta dal 14,6% al 29,1%. Ci sono comunque diversi rapporti molari ottimali tra ChCl e acido lattico in base ai diversi tipi di biomassa.

Il rapporto molare tra HBA e HBD non influenza soltanto l'estrazione della lignina, ma ha un effetto simile anche sulle prestazioni di idrolisi della cellulosa.

Con un adeguato rapporto molare tra HBA e HBD, è possibile ottenere un'elevata estrazione di lignina e resa di zucchero.

### **4.3 Condizioni di reazione del pretrattamento**

Analogamente ad altri processi di produzione, l'efficienza del pretrattamento dipende da molti parametri e condizioni di reazione correlati. L'ottimizzazione del processo è molto importante per l'intera procedura di pretrattamento della biomassa lignocellulosica.

Il rapporto solido-liquido, la temperatura di pretrattamento e il tempo di mantenimento alla temperatura massima sono variabili chiave del processo.



### 4.3.1 Effetto del rapporto tra solido e liquido sul pretrattamento DES

Il rapporto solido-liquido è uno dei parametri chiave nel pretrattamento DES. Riflette la quantità relativa di solvente che viene utilizzato nel processo.

La quantità di solvente ha un ruolo importante sull'effetto di frazionamento finale della biomassa. In base alle caratteristiche della biomassa da trattare, vengono utilizzati rapporti solido-liquido differenti.

A volte nel pretrattamento DES della biomassa lignocellulosica, sono stati utilizzati anche rapporti solidi-liquidi elevati, in particolare per la biomassa ad alta cristallinità. Un rapporto solido-liquido elevato comporta un elevato turnover di solvente (a parità di capacità di processamento della biomassa).

Per le bucce di patate (Procentese et al., 2015), con condizioni di pretrattamento  $\text{CHCl}_3/\text{glicerolo}$  (1:2)  $60^\circ\text{C}$  per tre ore, si è variato il rapporto solido liquido rispettivamente da 1:8, 1:16 a 1:32, il tasso di recupero della cellulosa è stato rispettivamente dell'84,2%, 92,8% e 98,1% e il tasso di delignificazione è aumentato rispettivamente del 15,6%, 21,04% al 23,31%.

Per i residui vegetali derivanti dalla produzione di olio di palma (*empty fruit bunches*) (Sai & Lee, 2019), sono stati studiati tre rapporti solido-liquido: 1:5, 1:10, 1:15 e i risultati hanno mostrato una tendenza alla riduzione della resa in zucchero rispettivamente del 41%, 49% e 46%. La resa in zuccheri prima sale e poi decresce lentamente con l'aumentare del rapporto.

Il rapporto ottimale tra solido e liquido è 1:10, che non solo è sufficiente per un'elevata resa finale di zuccheri riducenti, ma in questo studio impedisce un'eccessiva degradazione della biomassa.

Un rapporto liquido-solido troppo basso può impedire che i campioni di biomassa non possano essere completamente saturati dal DES. Sebbene il tasso di recupero della cellulosa sia molto alto, la lignina e l'emicellulosa non possono essere disciolte e rimosse. Con l'incremento del rapporto solido-liquido, il contenuto di cellulosa dei campioni di biomassa trattati con DES è aumentato fino a raggiungere un valore massimo per poi diminuire, mentre il tasso di delignificazione e di rimozione dell'emicellulosa hanno continuato a crescere.

Tuttavia, un rapporto solido-liquido troppo elevato può portare a un'eccessiva degradazione della biomassa. Allo stesso tempo, può causare:

- Spreco di solvente;
- Maggiore consumo di energia;
- Necessità di un sistema di recupero del solvente più complesso;
- Costi di pretrattamento più elevati;
- Sovradimensionamento dell'apparecchiatura per il pretrattamento.

In sintesi, considerando il volume dell'impianto di pretrattamento, la facilità di riciclaggio del DES, il tasso di rimozione della lignina, il tasso di recupero dei solidi e di ritenzione dei carboidrati, il rapporto solido-liquido deve essere scelto basandosi su tutti questi parametri.

#### *4.3.2 Effetto della temperatura*

L'effetto della temperatura è uno dei fattori principali nel pretrattamento con DES della biomassa lignocellulosica. La temperatura ha una correlazione negativa con il tasso di recupero del glucano e dello xilano. Con elevate temperature, la solubilizzazione della lignina migliora, ma aumenta il tasso di degradazione dei carboidrati (G. Yu et al., 2013).

Da un lato, la velocità di rimozione della lignina e quella di rimozione dell'emicellulosa sono maggiori quando la temperatura di reazione è molto elevata. Dall'altro, il tasso di recupero della cellulosa diminuisce.

Condizioni di pretrattamento moderate, basate su basse temperature, hanno molti vantaggi:

- Minor concentrazione di inibitori tossici prodotti nel pretrattamento;
- Costi di processo inferiori;
- Maggiore sostenibilità ecologica.

Pertanto, considerando il successivo processo di saccarificazione enzimatica, la resa finale di zuccheri riducenti e la sicurezza operativa, si deve scegliere una temperatura di reazione adeguata.

#### *4.3.3 Effetto del tempo di pretrattamento*

Anche il tempo di pretrattamento è un parametro significativo: aumentandolo, la frazione di recupero solida si riduce a causa del fatto che i componenti dei carboidrati nella biomassa lignocellulosica possono essere (facilmente) disciolti e degradati. Quindi, ottimizzare il tempo di pretrattamento è necessario per assicurare sia un'elevata resa in lignina, sia per evitare la degradazione dei carboidrati.

Con l'aumento della durata di pretrattamento, il tasso di recupero della cellulosa diminuisce gradualmente, mentre il tasso di perdita dello xilano e la rimozione della lignina migliorano (Xu et al., 2018).

Aumentando il tasso di rimozione della lignina, si riduce l'assorbimento degli enzimi e aumenta l'area accessibile dei polisaccaridi. Con l'aumento della durata di pretrattamento, si può ottenere un migliore rigonfiamento delle fibre di cellulosa grazie alla penetrazione del solvente nei fasci di fibre della biomassa (Kim et al., 2008).

In un processo industriale, tempi di pretrattamento più lunghi si traducono in una minore efficienza di produzione nonché in impianti di dimensioni maggiori a parità di capacità di trattamento della biomassa. Pertanto, è necessario adottare il tempo di reazione del pretrattamento ottimale in base al consumo di energia e all'efficienza del pretrattamento stesso.

#### *4.3.4 Considerazione completa delle condizioni di pretrattamento*

Durante il processo di conversione della biomassa, gli zuccheri riducenti come il glucosio possono essere rilasciati dalla matrice della parete cellulare della biomassa

lignocellulosica nel surnatante liquido durante l'idrolisi enzimatica successiva al pretrattamento.

La resa totale in zucchero riducente dipende dalle condizioni di pretrattamento. Tempo e temperatura sufficiente e rapporto/solido liquido adatto sono necessari per un'efficiente interazione tra il DES e i componenti della biomassa lignocellulosica. Un efficiente pretrattamento può abbattere la recalcitranza della biomassa lignocellulosica.

In genere, con l'aumento della temperatura e della durata del pretrattamento, aumenta il tasso di rimozione dell'emicellulosa e aumenta il tasso di recupero della cellulosa. Tuttavia, se aumentano troppo, la cellulosa può degradarsi e la resa di zuccheri fermentabili può diminuire (Ho & Wu, 2020).

All'interno di un certo intervallo basato su DES e biomassa diverse, il tasso di rimozione della lignina e la resa degli zuccheri crescono all'aumentare della temperatura di pretrattamento, del tempo e del rapporto solido/liquido. Tuttavia, quando il valore di queste tre variabili si prolunga ulteriormente o continua ad aumentare, l'efficienza di pretrattamento e la saccarificazione enzimatica possono diminuire gradualmente. Le ragioni sono:

- Secondo Chen, un eccessivo aumento della temperatura di pretrattamento può rompere la stabilità termica del DES (CHEN et al., 2018);
- Secondo Sai e Lee, un aumento eccessivo della temperatura di pretrattamento, del tempo e del rapporto solido/liquido può portare alla diminuzione della resa totale finale di zucchero a causa dell'eccessiva degradazione dei carboidrati, della degradazione del DES e dell'aggregazione della biomassa (Sai & Lee, 2019).

Queste tre variabili del processo di pretrattamento formano un sistema strettamente integrato con una relazione altamente interattiva tra loro.

La scelta di queste variabili per le condizioni di pretrattamento DES è molto importante per garantire un'elevata efficienza della conversione della biomassa lignocellulosica incentrata sulla produzione di biocarburanti.

## 5. CONCLUSIONI

Lo scopo principale di questo lavoro di tesi è quello di esaminare la possibilità di utilizzo della tecnologia NaDES per frazionare la matrice lignocellulosica derivante dai sarmenti. Questo può rendere più efficiente e sostenibile il processo di pretrattamento nella produzione di bioetanolo di seconda generazione.

I solventi eutettici naturali sono risultati essere una valida alternativa all'utilizzo dei solventi tradizionali nel frazionamento del materiale lignocellulosico, sia in termini di efficacia, ma anche dal punto di vista ecologico.

Dato che i NaDES sono biodegradabili, non tossici, a basso costo (poiché sono abbondanti in natura) e facili da reperire e preparare, questi solventi possono rappresentare un punto di svolta tecnologico che avvicina sempre di più l'uomo e la natura, processo favorito dalla biocompatibilità e dal ridotto impatto ambientale.

I solventi eutettici naturali si dimostrano in diverse occasioni più efficienti dei solventi tradizionali, permettendo, inoltre, un ambiente più sicuro per i lavoratori grazie alla non volatilità a temperatura ambiente e alla non tossicità.

Siccome le sostanze che possono dare origine a questi solventi eutettici naturali sono centinaia e dato che l'argomento è molto recente, lo spettro di sostanze utilizzabili è stato solo parzialmente esplorato ma si sono riusciti ad ottenere comunque importanti risultati.

I NaDES hanno uno spettro di solubilità molto ampio grazie alla loro capacità di essere formulati e riformulati in modo diverso per adattarsi a sostanze diverse e ciò fa in modo che possano essere un luogo adatto per le reazioni enzimatiche, per lo stoccaggio e il mezzo adatto per il trasporto di molecole bioattive.

L'utilizzo dei NaDES nella fase di pretrattamento relativa alla produzione di bioetanolo di seconda generazione permetterebbe di ottenere una maggiore efficienza della bioconversione complessiva andando anche a salvaguardare l'ambiente e gli operatori.

La ricerca relativa a questa tipologia di solventi innovativi è molto attiva e si spera che porti all'utilizzo dei solventi eutettici naturali nei processi di pretrattamento all'interno della bioraffineria.

Le opportunità di applicazione e ricerca in questo campo sono quindi molteplici e promettenti, e puntano a risolvere molte delle problematiche collegate all'utilizzo dei solventi tradizionali sia su piccola scala che a livello industriale.



## 6. BIBLIOGRAFIA

- Alshana, U., Hassan, M., Al-Nidawi, M., Yilmaz, E., & Soylak, M. (2020). Switchable-hydrophilicity solvent liquid-liquid microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *131*, 116025. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116025>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource technology*, *101*(13), 4851–4861.
- Cai, J., He, Y., Yu, X., Banks, S. W., Yang, Y., Zhang, X., Yu, Y., Liu, R., & Bridgwater, A. V. (2017). Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *76*, 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.072>
- Chandra, R. P., Bura, R., Mabee, W. E., Berlin, d A., Pan, X., & Saddler, J. N. (2007). Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Biofuels*, 67–93.
- Chen, L., Yu, Q., Wang, Q., Wang, W., Qi, W., Zhuang, X., Wang, Z., & Yuan, Z. (2019). A novel deep eutectic solvent from lignin-derived acids for improving the enzymatic digestibility of herbal residues from cellulose. *Cellulose*, *26*(3), 1947–1959.
- Chen, W., Xue, Z., Wang, J., Jiang, J., Zhao, X., & Mu, T. (2018). Investigation on the Thermal Stability of Deep Eutectic Solvents. *Wuli Huaxue Xuebao*, *34*(8), 904–911. <https://doi.org/10.3866/PKU.WHXB201712281>
- D'Agostino, C., Harris, R. C., Abbott, A. P., Gladden, L. F., & Mantle, M. D. (2011). Molecular motion and ion diffusion in choline chloride based deep eutectic solvents studied by <sup>1</sup>H pulsed field gradient NMR spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *13*(48), 21383. <https://doi.org/10.1039/c1cp22554e>



- Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: Mixtures of solids as extraction solvents. *Journal of natural products*, 76(11), 2162–2173.
- Davis, S. J. (2015). *Deep Eutectic Solvents Derived From Inorganic Salts* [Thesis, University of Leicester]. [https://figshare.com/articles/thesis/Deep\\_Eutectic\\_Solvents\\_Derived\\_From\\_Inorganic\\_Salts/10141571/1](https://figshare.com/articles/thesis/Deep_Eutectic_Solvents_Derived_From_Inorganic_Salts/10141571/1)
- Flores-Velázquez, V., Córdova-Pérez, G. E., Silahua-Pavón, A. A., Torres-Torres, José. G., Sierra, U., Fernández, S., Godavarthi, S., Ortiz-Chi, F., & Espinosa-González, C. G. (2020). Cellulose obtained from banana plant waste for catalytic production of 5-HMF: Effect of grinding on the cellulose properties. *Fuel*, 265, 116857. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116857>
- Francisco, M., Van Den Bruinhorst, A., & Kroon, M. C. (2012). New natural and renewable low transition temperature mixtures (LTTMs): Screening as solvents for lignocellulosic biomass processing. *Green Chemistry*, 14(8), 2153–2157.
- GalileoDiscovery—28) Procentese, A., Johnson, E., Orr, V., Campanile, A. G., Wood, J. A., Marzocchella, A., & Rehmann, L. (2015). Deep eutectic solvent pretreatment and subsequent saccharification of corncob. *Bioresource technology*, 192, 31-36. (s.d.). Recuperato 14 luglio 2022, da <https://galileodiscovery.unipd.it>
- Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Mateo, C. R., & del Monte, F. (2009). Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures. *Langmuir*, 25(10), 5509–5515.
- Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., Horton, A., Adhikari, L., Zelovich, T., & Doherty, B. W. (2020). Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications. *Chemical reviews*, 121(3), 1232–1285.
- Ho, M. C., & Wu, T. Y. (2020). Sequential pretreatment with alkaline hydrogen peroxide and choline chloride:copper (II) chloride dihydrate – Synergistic

- fractionation of oil palm fronds. *Bioresource Technology*, *301*, 122684–122684. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122684>
- Jablonský, M., Škulcová, A., Kamenská, L., Vrška, M., & Šíma, J. (2015). Deep Eutectic Solvents: Fractionation of Wheat Straw. *BioResources*, *10*(4), 8039–8047. <https://doi.org/10.15376/biores.10.4.8039-8047>
- Jessop, P. G., Heldebrant, D. J., Li, X., Eckert, C. A., & Liotta, C. L. (2005). Reversible nonpolar-to-polar solvent. *Nature*, *436*(7054), 1102–1102.
- Jessop, P. G., Jessop, D. A., Fu, D., & Phan, L. (2012). Solvatochromic parameters for solvents of interest in green chemistry. *Green Chemistry*, *14*(5), 1245. <https://doi.org/10.1039/c2gc16670d>
- Jessop, P. G., Mercer, S. M., & Heldebrant, D. J. (2012). CO<sub>2</sub>-triggered switchable solvents, surfactants, and other materials. *Energy & Environmental Science*, *5*(6), 7240–7253.
- Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N. S., Ladisch, M. R., Bals, B., Balan, V., & Dale, B. E. (2008). Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distillers' grains at high-solids loadings. *Bioresource Technology*, *99*(12), 5206–5215. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.031>
- Kumar, A. K., Parikh, B. S., & Pravakar, M. (2016). Natural deep eutectic solvent mediated pretreatment of rice straw: Bioanalytical characterization of lignin extract and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass residue. *Environmental science and pollution research*, *23*(10), 9265–9275.
- Li, A.-L., Hou, X.-D., Lin, K.-P., Zhang, X., & Fu, M.-H. (2018). Rice straw pretreatment using deep eutectic solvents with different constituents molar ratios: Biomass fractionation, polysaccharides enzymatic digestion and solvent reuse. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *126*(3), 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.011>
- Machado, A. A. (2012). From the first to the second twelve principles of Green Chemistry. *Química Nova*, *35*, 1250–1259.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, *96*(6), 673–686.

- New, E. K., Wu, T. Y., Tien Loong Lee, C. B., Poon, Z. Y., Loow, Y.-L., Wei Foo, L. Y., Procentese, A., Siow, L. F., Teoh, W. H., Nik Daud, N. N., Jahim, J. Md., & Mohammad, A. W. (2019). Potential use of pure and diluted choline chloride-based deep eutectic solvent in delignification of oil palm fronds. *Process Safety and Environmental Protection*, *123*, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.11.015>
- Ong, V. Z., Wu, T. Y., Lee, C. B. T. L., Cheong, N. W. R., & Shak, K. P. Y. (2019). Sequential ultrasonication and deep eutectic solvent pretreatment to remove lignin and recover xylose from oil palm fronds. *Ultrasonics Sonochemistry*, *58*, 104598–104598. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.05.015>
- Phan, L., Andreatta, J. R., Horvey, L. K., Edie, C. F., Luco, A.-L., Mirchandani, A., Darensbourg, D. J., & Jessop, P. G. (2008). Switchable-polarity solvents prepared with a single liquid component. *The Journal of organic chemistry*, *73*(1), 127–132.
- Phan, L., Chiu, D., Heldebrant, D. J., Huttenhower, H., John, E., Li, X., Pollet, P., Wang, R., Eckert, C. A., & Liotta, C. L. (2008). Switchable solvents consisting of amidine/alcohol or guanidine/alcohol mixtures. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *47*(3), 539–545.
- Procentese, A., Johnson, E., Orr, V., Campanile, A. G., Wood, J. A., Marzocchella, A., & Rehmann, L. (2015). Deep eutectic solvent pretreatment and subsequent saccharification of corncob. *Bioresource technology*, *192*, 31–36.
- Rastogi, M., & Shrivastava, S. (2017). Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *80*, 330–340.
- Ren, H., Chen, C., Wang, Q., Zhao, D., & Guo, S. (2016). The Properties of Choline Chloride-based Deep Eutectic Solvents and their Performance in the Dissolution of Cellulose. *BioResources*, *11*(2), 5435–5451. <https://doi.org/10.15376/biores.11.2.5435-5451>
- Sai, Y. W., & Lee, K. M. (2019). Enhanced cellulase accessibility using acid-based deep eutectic solvent in pretreatment of empty fruit bunches. *Cellulose (London)*, *26*(18), 9517–9528. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02770-w>

- Sekharan, T. R., Chandira, R. M., Tamilvanan, S., Rajesh, S. C., & Venkateswarlu, B. S. (2022). Deep eutectic solvents as an alternate to other harmful solvents. *Review*, *12*, 847–860.
- Simangunsong, E., Ziegler-Devin, I., Chrusciel, L., Girods, P., Wistara, N. J., & Brosse, N. (2020). Steam Explosion of Beech Wood: Effect of the Particle Size on the Xylans Recovery. *Waste and Biomass Valorization*, *11*(2), 625–633. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0522-4>
- Sirviö, J. A., Visanko, M., & Liimatainen, H. (2016). Acidic Deep Eutectic Solvents As Hydrolytic Media for Cellulose Nanocrystal Production. *Biomacromolecules*, *17*(9), 3025–3032. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00910>
- Smink, D., Juan, A., Schuur, B., & Kersten, S. R. A. (2019). Understanding the Role of Choline Chloride in Deep Eutectic Solvents Used for Biomass Delignification. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *58*(36), 16348–16357. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b03588>
- Song, Y., Chandra, R. P., Zhang, X., Tan, T., & Saddler, J. N. (2019). Comparing a deep eutectic solvent (DES) to a hydrotrope for their ability to enhance the fractionation and enzymatic hydrolysis of willow and corn stover. *Sustainable Energy & Fuels*, *3*(5), 1329–1337.
- Sorn, V., Chang, K.-L., Phitsuwan, P., Ratanakhanokchai, K., & Dong, C.-D. (2019). Effect of microwave-assisted ionic liquid/acidic ionic liquid pretreatment on the morphology, structure, and enhanced delignification of rice straw. *Bioresource technology*, *293*, 121929.
- Suopajärvi, T., Ricci, P., Karvonen, V., Ottolina, G., & Liimatainen, H. (2020). Acidic and alkaline deep eutectic solvents in delignification and nanofibrillation of corn stalk, wheat straw, and rapeseed stem residues. *Industrial Crops and Products*, *145*, 111956. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111956>
- Tan, Y. T., Ngoh, G. C., & Chua, A. S. M. (2018). Evaluation of fractionation and delignification efficiencies of deep eutectic solvents on oil palm empty fruit bunch. *Industrial crops and products*, *123*, 271–277.
- Xia, Q., Liu, Y., Meng, J., Cheng, W., Chen, W., Liu, S., Liu, Y., Li, J., & Yu, H. (2018). Multiple hydrogen bond coordination in three-constituent deep eutectic

- solvents enhances lignin fractionation from biomass. *Green chemistry*, 20(12), 2711–2721.
- Xu, F., Sun, J., Wehrs, M., Kim, K. H., Rau, S. S., Chan, A. M., Simmons, B. A., Mukhopadhyay, A., & Singh, S. (2018). Biocompatible Choline-Based Deep Eutectic Solvents Enable One-Pot Production of Cellulosic Ethanol. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(7), 8914–8919. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01271>
- Xu, H., Che, X., Ding, Y., Kong, Y., Li, B., & Tian, W. (2019). Effect of crystallinity on pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass based on multivariate analysis. *Bioresource technology*, 279, 271–280.
- Xu, Z., & Huang, F. (2014). Pretreatment methods for bioethanol production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174(1), 43–62.
- Yu, G., Li, B., Liu, C., Zhang, Y., Wang, H., & Mu, X. (2013a). Fractionation of the main components of corn stover by formic acid and enzymatic saccharification of solid residue. *Industrial Crops and Products*, 50, 750–757. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.053>
- Yu, H., Hu, J., & Chang, J. (2011). Selective Separation of Wood Components Based on Hansen's Theory of Solubility. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(12), 7513–7519. <https://doi.org/10.1021/ie102443p>
- Zhang, C.-W., Xia, S.-Q., & Ma, P.-S. (2016). Facile pretreatment of lignocellulosic biomass using deep eutectic solvents. *Bioresource technology*, 219, 1–5.



## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero dedicare questo spazio alle persone che hanno contribuito, con il loro supporto, alla realizzazione della mia tesi.

In primis, un ringraziamento speciale al mio relatore, il Professor Marco Bravi, per la sua grande pazienza, per i suoi indispensabili consigli, per le conoscenze acquisite grazie al suo corso e durante tutto il percorso di stesura dell'elaborato.

Colgo l'occasione per ringraziare sentitamente il professor Simone Vincenzi, mio correlatore, per la stima e la gentilezza che ha sempre mostrato nei miei confronti.

Una menzione doverosa è per la Dottoressa Deborah Franceschi che ha supportato il mio iniziale lavoro in laboratorio con competenza e grande disponibilità.

Ringrazio infinitamente i miei genitori che mi hanno sempre sostenuto, appoggiando ogni mia decisione, fin dalla scelta del mio percorso di studi.

Un grazie di cuore a mia madre. È grazie a lei che ho superato i momenti più difficili. Senza i suoi consigli, non ce l'avrei mai fatta.

Infine, dedico questa tesi a me stesso, ai miei sacrifici e alla tenacia che mi hanno permesso di arrivare fin qui.