



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica
Curriculum Scienze Chimiche

**Potenzialità di *Chaetomorpha
linum* (alghe verdi) per
produzione di biocarburanti.**

**Potentiality of *Chaetomorpha
linum* (green algae) for biofuel
production.**

Relatore

Ugo Bardi

Correlatore

Alessio Papini, Massimo Innocenti

Candidato

Benedetto Di Vico

Anno Accademico 2015/2016

Indice

1 INTRODUZIONE

1.1 IL BIOETANOLO COME ALTERNATIVA AI COMBUSTIBILI CONVENZIONALI6
1.2 LA LAGUNA DI ORBETELLO.	8
1.3 LE ALGE VERDI.	10
1.3.1 L'ALGA <i>CHAETOMORPHA LINUM</i>	13
1.4 SCOPO E PROCEDIMENTO.	14

2 MATERIALI E METODI

2.1 TECNICHE DI TRASFORMAZIONE17
2.1.1 PRETRATTAMENTO CAMPIONE17
2.1.2 L'AUTOCLAVE.	21
2.1.3 IDROLISI ENZIMATICA.	23
2.1.4 LA FERMENTAZIONE	25
2.2 DETERMINAZIONE GLUCOSIO ED ETANOLO.	28
2.2.1 LO SPETTROFOTOMETRO UV-VISIBILE.	29
2.2.2 KIT GLUCOSIO	34
2.2.3 KIT ETANOLO.	35
2.3 IDROLISI E FERMENTAZIONE IN SIMULTANEA (SSF)	36
2.4 DESCRIZIONE ESPERIENZA RIASSUNTIVA	37

3 DISCUSSIONE RISULTATI

3.1 RESA GLUCOSIO.	43
3.2 RESA ETANOLO	48

3.3 ANALISI PROCEDIMENTI. 54

4 CONCLUSIONI.57

5 BIBLIOGRAFIA 60

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 IL BIOETANOLO COME ALTERNATIVA AI COMBUSTIBILI CONVENZIONALI

Nella corsa alla progettazione e alla produzione di biocarburanti, le alghe rappresentano una delle più consistenti e interessanti fonti di energia rinnovabili provenienti dalle biomasse, anche se, essendo una tecnologia in fase di sviluppo, esistono ancora difficoltà di produzione dovute alla complessa articolazione delle varie fasi di lavorazione che ne fanno una tecnologia ancora non concorrenziale rispetto ai carburanti di origine fossile. Le macroalghe, pertanto, potrebbero essere un contributo realistico come materia prima adatta alla produzione di biocombustibili, dal momento che non sono in competizione con le colture terrestri e sono diffuse in abbondanza in tutto il globo (Raven, Evert, 2002). Tuttavia, il loro pieno potenziale può essere sfruttato solo se le tecnologie di coltivazione, di raccolta e di conversione saranno efficienti e poco costose. Per questo motivo, in epoca recente, si sono moltiplicati numerosi progetti di ricerca riguardanti questa particolare tipologia di biomassa poiché manifesta notevoli vantaggi rispetto ai carburanti di origine fossile e ai biocarburanti derivanti dalla coltura delle terre emerse come mais e barbabietola (Esmeralda et al., 2001). Infatti rispetto ai primi, il consumo di bioetanolo presenta una notevole diminuzione di emissione di CO₂ e una completa assenza di composti organici nocivi derivanti dalla combustione dei carburanti fossili; senza contare il fatto che le alghe assorbono la CO₂ tramite la fotosintesi durante l'arco della loro vita (Clini, Caltagirone, 2008). Pertanto, le emissioni di CO₂ derivanti dal biocombustibile sono in parte riassorbite dalle

colture da cui si ottiene la materia prima per la loro produzione, come affermano Cline e Caltagirone (2008). Questo fattore va in contro alle direttive europee riguardanti la diminuzione delle emissioni di CO₂ e alla tutela dell'ambiente. Rispetto ai biocarburanti derivanti dalla coltura delle terre emerse, invece, le alghe non sono considerate un bene economico destinato alla nutrizione dell'uomo e quindi non vanno ad aggravare la scarsità di cibo ed a determinare una crescita dei prezzi alimentari, come afferma Von Braun (2007). Si elimina, pertanto, il rischio della cannibalizzazione del settore agroalimentare da parte del settore energetico. Inoltre la loro coltivazione non occupa territorio emerso e quindi non va ad occupare spazio destinato all' agricoltura, andando così a non aggravare ulteriormente il problema della deforestazione. Pertanto l'acquacoltura ha anche un minore impatto ambientale essendo praticata nelle acque superficiali vicino alle coste o in alto mare (Von Braun, 2007).

Un ulteriore aspetto positivo nello sfruttamento delle alghe è che esse stanno diventando sempre più abbondanti in tutto il globo, soprattutto nell' area mediterranea, a causa del riscaldamento globale e dell'aumento dei nutrienti di origine umana immessi nelle zone costiere e lagunari. Quindi una loro bioconversione andrebbe a risolvere il problema delle fioriture algali che causano distrofie più o meno gravi nell' ecosistema in cui si sviluppano (Cecere et al, 2009).

Come carburante l'etanolo può essere usato puro (E100) o miscelato con benzina in diversi rapporti: in questo caso si parla di E85, E95 o E10 quando la percentuale di etanolo nella miscela è rispettivamente 85, 95 e 10 (Esmeralda et al., 2001). Il minor contenuto di idrocarburi incombusti, o parzialmente ossidati (per esempio aldeidi) comporta un minore impatto ambientale. I principali benefici ambientali che si possono avere utilizzando come biocombustibile l' etanolo, anche come miscela con benzina, sono:

- riduzione del livello di ozono negli strati bassi dell'atmosfera. Molti prodotti secondari della combustione degli idrocarburi formano ozono attraverso reazioni fotochimiche; tra questi, il monossido di carbonio, gli idrocarburi incombusti, il

benzene e gli ossidi di azoto. L'ozono della stratosfera ci protegge dalle radiazioni ultraviolette, ma se presente negli strati bassi (troposfera) causa problemi respiratori e danneggia le piante. L'uso di combustibili ossigenati, come l'etanolo, riduce la formazione dell'ozono in quanto i gas prodotti dalla combustione sono meno reattivi (Esmeralda et al., 2001).

- Riduzione dei gas serra . Anche nel caso di una perfetta combustione degli idrocarburi, i gas prodotti (CO₂, H₂O) sarebbero responsabili di un aumento dell'effetto serra dell'atmosfera. Nelle condizioni ordinarie, l'uso di miscele bioetanolo-benzina come E85 o E10 potrebbero ridurre l'emissione di gas serra rispettivamente del 37.1% e del 3.9% (Esmeralda et al., 2001).

- Riduzione delle emissioni da parte di miscele di etanolo. E' accertato che miscele di combustibili contenenti il 10% di etanolo riducono del 25-30% le emissioni di monossido di carbonio e del 6-10% di anidride carbonica. Per quanto riguarda i composti organici volatili (VOC), si riscontra una significativa diminuzione di essi in miscele a medio-alto contenuto di etanolo. Poiché l'etanolo non contiene zolfo anche le emissioni di anidride solforosa sono ridotte (Esmeralda et al., 2001).

1.2 LA LAGUNA DI ORBETELLO

In questa trattazione ci occuperemo della laguna di Orbetello, che presenta annualmente una cospicua fioritura algale a causa delle condizioni eutrofiche della laguna (Giusti et al. , 2010). Per questo motivo annualmente le alghe vengono prelevate e depositate vicino la laguna, in attesa di essere smaltite come rifiuti

speciali. Soltanto negli ultimi anni, invece di prelevare le alghe, è stato attuato un processo di sifonamento del fondale lagunare, nel tentativo di ridurre la quantità di fioritura algale (McGlathery, 1999) . Questo processo però non ha portato ai risultati sperati.

La laguna ha un' estensione di circa 27km². La profondità media è circa 1 metro e le escursioni di marea non superano gli 0.4 metri. La comunicazione diretta con il mare avviene grazie al canale Ansedonia, per la laguna di Levante, mentre la Laguna di Ponente, comunica direttamente con il mare per mezzo del canale Nassa, e, indirettamente, con il canale Fibbia, collegato con il tratto terminale del fiume Albegna. Tuttavia a causa degli scarsi scambi con le acque marine e di una forte presenza di agenti nutrienti dovuti alla presenza di allevamenti ittici e altre attività umane, si verifica annualmente una proliferazione algale con distrofie più o meno gravi (Marsili-Libelli , 2014).

Da alcuni anni sono state intraprese importanti azioni e procedure gestionali finalizzate al risanamento della laguna, tra le quali l'incremento dello scambio tra mare e laguna grazie alla messa in esercizio di idrovore nel periodo primaverile-estivo. Nonostante ciò i risultati non sono stati soddisfacenti, con una proliferazione algale che è stata stimata sulle 5000t/anno di materiale, umido per il 70 % del peso (Bastianoni et al., 2008). Tutto ciò è il risultato di un intenso processo di eutrofizzazione, condizionato anche dalla presenza di allevamenti ittici e acquacoltura (Gennaro et al, 2006). Pertanto il processo naturale di eutrofizzazione, accelerato dalle attività antropiche, impone una raccolta sistematica della biomassa algale con dinamiche e costi spesso molto impegnativi anche poichè lo smaltimento della biomassa è da attuarsi in forma di rifiuti speciali. Il costo annuale in toto è stato stimato di 600.000 euro (Bastianoni et al., 2008) .

Il punto è che la massa vegetale una volta sviluppatasi in maniera abnorme in banchi algali, se non raccolta, mano a mano muore e si va a depositare sul fondale accumulandosi. Inoltre l'acqua della laguna è poco profonda e ferma. Pertanto l'accumulo e la crescita incontrollata, come è facile intuire, diventano nocivi e in ultima istanza conducono alla morte per soffocamento di tutto quanto c'è di vivo,

flora e fauna dell'habitat circostante, ottenendo una forte eutrofizzazione della laguna e attivando quei processi biochimici caratteristiche delle acque prive di ossigeno (Lenzi et al., 2003). Tutto ciò va a colpire duramente l'economia umana dipendente dalla laguna.

Per quanto riguarda lo sviluppo algale, due sono le specie dominanti: la *Gracilariopsis longissima* (Rhodophyceae) che ricopre circa il 60% della popolazione e la *Chaetomorpha linum* (Ulvophyceae) che ricopre invece circa il 40%, ma le proporzioni variano di anno in anno (Bastianoni et al., 2008). La prima è un' alga rossa, particolarmente usata per la produzione di gel di agar. Infatti contiene nella parete cellulare e nella matrice intercellulare uno dei principali carboidrati adatti alla gelificazione. E' pertanto utilizzata nell'industria idrocolloide. Per quanto riguarda invece la *C. Linum*, la parete cellulare ha una parte esterna lamellare prevalentemente in cellulosa che è altamente cristallina e una matrice interna amorfa composta da un complesso polimero ramificato di arabinosio e galattosio, con residui di xilosio (Bastianoni et al., 2008). Pertanto quest'alga presenta un' elevata potenzialità di zuccheri estraibili.

E' già stato provato a sfruttare queste alghe in diverse maniere, l'alga rossa per produrre agar e la verde per fare carta, ma entrambi i tentativi sono falliti rispettivamente per la piccola resa o per la bassa qualità del prodotto (Bastianoni et al., 2008).

1.3 LE ALGHE VERDI

Le alghe verdi, o Chlorophyta, raggruppano oltre 8000 specie e sono organismi che si differenziano molto sia nella struttura che nei cicli vitali. Sebbene la maggior parte siano acquatiche, esse sono comuni in molti habitat(superficie nevosa,

tronchi degli alberi, suolo) (Mauseth , 2003). Le forme di acqua dolce sono quasi tutte di dimensioni microscopiche mentre quelle marine sono generalmente macroscopiche (Reinert, 1980). Le alghe verdi costituiscono un gruppo naturale distinto da tutte le altre divisioni algali in quanto la sostanza di riserva, l' amido, si accumula all'interno del cloroplasto. Sono inoltre componenti di associazioni simbiotiche, come i funghi, protozoi d 'acqua dolce e spugne (Reinert, 1980). Inoltre è presente una cospicua e varia popolazione di alghe verdi microscopiche e unicellulari nel biofilm superficiale dei deserti di tutto il mondo (Mauseth, 2003). La sistematica molecolare e i dati fisiologici mostrano che le alghe dei deserti si siano evolute dalle alghe di acqua dolce (Reinert, 1980). Alcune alghe verdi producono una gran quantità di carotenoidi che agiscono da filtro contro l' elevata intensità luminosa e che conferiscono alle alghe colori più scuri che variano dall'arancione al marrone. La maggior parte delle alghe verdi è di acqua dolce , ma alcuni gruppi sono marini (Mauseth, 2003). Le dimensioni sono molto ridotte, eccetto alcune specie di alghe marine (il tallo di *Codium magnum* del Messico, per esempio, può raggiungere una larghezza di 25cm e una lunghezza di oltre 8 metri) (Reinert, 1980).

La classificazione tradizionale raggruppa le alghe verdi in base alle loro caratteristiche esteriori: i flagellati unicellulari sono inseriti nello stesso gruppo, le alghe filamentose sono raggruppate assieme, e così via. Tuttavia le alghe verdi non sempre possono essere riconosciute in base alle loro struttura esterna(Nelson, Cox,2002). Ai giorni d'oggi, prove convincenti sui loro legami filogenetici sono rivelate da studi ultrastrutturali della mitosi, della citodieresi delle cellule riproduttive e da similarità della biologia molecolare (Reinert, 1980) . Questo nuovo approccio ha consentito di raggruppare le alghe verdi secondo un nuovo sistema, suddividendole in più classi. Le quattro classi più importanti delle alghe verdi sono: le Prasinophyceae, le Charophyceae, le Ulvophyceae e le Chlorophyceae.

Le classi sono state originariamente formulate nel 1970 da Karl Mattox e Kenneth Stewart alla Miami University of Ohio, e da Jeremy Pickett-Heaps presso

l'Università del Colorado (Mauseth, 2003). Il loro sistema di classificazione è basato in gran parte sulle caratteristiche ultrastrutturali. Successivamente indagini che utilizzano la genetica molecolare hanno verificato questo lavoro (Reinert, 1980).

	Micromonado- phyceae	Charophyceae	Ulvophyceae	Chlorophyceae
Posizione di flagelli nella cella		Laterale	Anteriore	Anteriore
radici microtubolari		Banda larga più una banda più piccola	Quattro, arrangiate a croce	Quattro, arrangiate a croce
rizoplasti	Può essere presente	No	Comune	Comune
Struttura a più strati	Può essere presente	si	No	No
flagelli	Scaglie	Scaglie	Scaglie	Teca
Interzonal spindle	Persistente	Persistente	Persistente	Collapsing
formazione della nuova parete trsversale		fragmoplasto	solco di divisione	ficoplasto
complesso terminale della cellulosa		Rosette	riga lineare	riga lineare
ocelli		assente	Comune	Comune
Degradazione glicolato	Glicolato deidrogenasi	Glicolato ossidasi	Glicolato deidrogenasi	Glicolato deidrogenasi
Degradazione urea		Ureasi	Ureasi	Urea amidolasi

Cu/Zn superossido dismutasi		Presente	Assente	Assente
-----------------------------------	--	----------	---------	---------

Figura 1: *Tabella quattro classi più importanti delle alghe verdi: Prasinophyceae, Charophyceae, Ulvophyceae e Chlorophyceae.*

1.3.1 L'ALGA *CHAETOMORPHA LINUM*

La *C. Linum* appartiene alla classe ulvophyceae, ordine cladophorales, famiglia cladophoraceae. E' diffusa soprattutto nelle acque salmastre, formando talvolta fastidiose fioriture, viscide e fetide. I suoi filamenti crescono comunemente costituendo densi agglomerati che fluttuano liberamente o che si attaccano alle rocce (Reinert, 1980).

E' comune in Mediterraneo, nell' Adriatico e nell'Oceano Atlantico. In Italia è presente in forme concentrate nel Golfo di Trieste, lagune di Venezia e di Orbetello e Varano (Specchiulli et al., 2008). Vive sia in mare che in acque salmastre nell'ambiente del mesolitorale. Il tallo è inizialmente fisso al substrato ed è formato da lunghi filamenti eretti che in seguito possono costituire masse flottanti. La colorazione può essere verde -giallastra o verde scuro (Mauseth, 2003).

L'attacco al substrato avviene tramite rizoidi. I filamenti variano la loro lunghezza da 5 a 35 cm. La riproduzione è sia sessuata mediante isogamia che asessuata tramite zoospore (Reinert, 1980). In ambienti eutrofizzati, se presente, è una delle specie che si sviluppano maggiormente, come si vede nel caso della laguna di Orbetello (Marsili-Libelli, 2014). Il loro aumento numerico presso la superficie dello specchio d'acqua comporta una limitazione degli scambi gassosi (e quindi anche del passaggio in soluzione dell'ossigeno atmosferico). Inoltre, quando le

aghe muoiono, vi è una conseguente forte diminuzione di ossigeno a causa della loro decomposizione ed i processi di putrefazione e fermentazione associati, liberano grandi quantità di ammoniaca, metano e acido solfidrico, rendendo l'ambiente inospitale per le altre forme di vita. Al posto dei microrganismi aerobici subentrano quelli anaerobici che sviluppano sostanze tossiche e maleodoranti. Si entra pertanto in una condizione di forte eutrofizzazione.

In letteratura vi sono evidenze sperimentali che la *C. linum* possiede più cellulosa di molte alghe simili come la *S. japonica* e la *G. salicornia*, *Ulva lactuca* e la *Gracilaria longissima* (Schultz-Jensen N. et al. 2013). Inoltre questa biomassa è più simile in composizione alle biomasse provenienti da piante terrestri (Reinert, 1980). Sempre dalla letteratura apprendiamo che in 100g di materia secca la *C. linum* è composta da 34-38g di glucano, 6g di xilano, 9-10g di arabinano, 7g di composti organici non idrolizzabili (NHOC), 21-23g di cenere, 14g di pectine e 6g di cere (Schultz-Jensen N. et al. 2013). I glucani sono dei polisaccaridi lineari costituiti da molecole di glucosio, mentre arabinani e xilani sono rispettivamente forme polisaccaridi di arabinosio e xilosio e sono i principali componenti delle emicellulose che in contrapposizione alla cellulosa, la cui molecola lineare è formata da unità di solo glucosio, sono costituite da zuccheri differenti e hanno una struttura ramificata e non fibrosa.

1.4 SCOPO E PROCEDIMENTO

Simile ad altre biomasse cellulosiche, il glucano dell'alga *C. Linum* può essere convertito da enzimi in zuccheri adatti per la fermentazione alcolica. La

definizione dei metodi di pretrattamento, efficaci al fine di rendere accessibili le catene polisaccaridi all' azione enzimatica della cellulasi, è la questione chiave per la produzione di bioetanolo. Tuttavia, la tecnologia di conversione per la produzione di biocarburanti liquidi da macroalghe è ancora in una fase di sviluppo (Thomsen et al., 2009). I polisaccaridi delle alghe richiedono, pertanto, nuovi metodi di pretrattamento economici al fine di rendere i monomeri disponibili alla fermentazione. Tale metodo di pretrattamento deve essere semplice ed i prodotti devono essere altamente fermentabili, con una limitata produzione di residui non digeribili. Inoltre, i polisaccaridi dalla biomassa dovrebbero essere idrolizzati senza che avvenga anche una degradazione dello zucchero prodotto, che porta ad una riduzione della resa finale se non ad una produzione di inibitori dei vari processi(Gonzalez G et al., 1989).

Come pretrattamento è stato scelto uno di tipo termo-meccanico, ma esistono pretrattamenti anche di tipo chimico o biologico. Con trattamento termo-meccanico ci si riferisce ad un'operazione in cui la biomassa viene inizialmente macinata, per poi subire un trattamento in autoclave. Ne risulta un'azione sinergica molto efficace mediante il quale si rompe la struttura cristallina della cellulosa, rendendola così attiva all'attacco degli enzimi (Demerdash , Attia , 1997). Una volta ottenuta la soluzione di zuccheri grazie ad appositi enzimi, in questo caso viene usata la cellulasi *Aspergillus niger*, si procede alla fermentazione con l'utilizzo del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, il comune lievito di birra, che è specializzato nel convertire il glucosio in etanolo con rese elevate. Lo scopo pertanto è quello di trasformare la biomassa algale in bioetanolo, sfruttando così la sovrapproduzione algale presente nella laguna di Orbetello.

Tutto il procedimento è stato incentrato e influenzato al fine di seguire processi poco onerosi. Per far ciò sono state eseguite procedure semplici ma funzionali. Anche la scelta dell'enzima è cascata su un enzima poco costoso come l'*Aspergillus niger*. Lo scopo dell'esperienza è stato testare se l'alga prelevata direttamente dalla laguna presentasse inquinanti chimici o biologici, quali batteri,

che avrebbero inibito totalmente l'azione dell' enzima pilota e del lievito, generando una morte prematura (denaturamento) di questi ultimi. Pertanto la ricerca si pone come uno studio preliminare riguardante le potenzialità di questa biomassa. Se la fase preliminare terminerà con indici positivi, potranno nascere studi successivi incentrati sul miglioramento della resa sfruttando enzimi di ultima generazione specifici al processo.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 TECNICHE DI TRASFORMAZIONE

La trasformazione delle biomasse cellulosiche in etanolo prevede tre passaggi fondamentali: pretrattamento della biomassa (chimico o fisico); idrolisi enzimatica della cellulosa tramite l' utilizzo dell' enzima cellulasi e allo scopo di ottenere zuccheri fermentabili; fermentazione del glucosio, prodotto durante l'idrolisi, in etanolo, tramite l'utilizzo alcuni microorganismi, i lieviti (Philippidis et al, 1992).

2.1.1 PRETRATTAMENTO CAMPIONE

Il pretrattamento è una procedura fondamentale se si vuole ottenere una resa finale soddisfacente. Infatti se si sottoponesse un materiale grezzo cellulosico a idrolisi enzimatica, le rese sarebbero bassissime, secondo la letteratura intorno al 5-10%, anche ricorrendo ad un elevato rapporto enzima/substrato e procedendo con lunghi tempi di reazione (Esmeralda et al. 2001). Tutto ciò è correlabile all' eccessiva dimensione degli enzimi che non riescono di penetrare nella matrice cellulosica, in particolare nelle zone cristalline formate dalla cellulosa. Per quanto riguarda lo scopo del nostro lavoro, i carboidrati, e la cellulosa in particolare, possono essere utilizzati per ottenere etanolo. Il processo necessita che i carboidrati presenti naturalmente nella biomassa siano ridotti a zuccheri semplici grazie al lavoro degli enzimi. Nel caso della cellulosa, si ottiene il glucosio, mentre dall'emicellulosa si

ottiene una miscela di zuccheri, tra cui lo xylosio e arabinosio. Per migliorare l'accessibilità della biomassa, quindi, è necessario uno stadio preliminare all'azione degli enzimi, che sfibri a livello microscopico il materiale, ovvero una fase che modifichi la morfologia, favorendo la rottura dei legami chimici tra i vari componenti della biomassa, per rendere più efficiente e penetrante l'azione degli agenti biologici. Vi sono tre tipologie di pretrattamento che si sono dimostrate efficaci verso questo genere di composti:

- Pretrattamenti di tipo chimico:

Questo tipo di pretrattamento fa uso di solventi che indeboliscono i legami del campione attraverso azioni chimiche. Tra questi vi sono quelli effettuati con soluzioni diluite di acido solforico, soda, o solventi (etanolo, metanolo) in grado di rimuovere parzialmente anche la lignina se si tratta di composti lignocellulosici. Tuttavia sono processi che comportano un elevato consumo di "chemicals" e sono caratterizzati da un impatto ambientale elevato.

- Pretrattamenti di tipo biologico:

In questi tipo di pretrattamento vengono impiegati microrganismi in grado di "sfibrare" la biomassa, in modo da "scoprire" la fibra cellulosa. Pur essendo molto efficaci, questi metodi sono poco pratici, perché richiedono lunghi tempi di permanenza della biomassa in appositi bioreattori.

- Pretrattamenti di tipo meccanico e termo-meccanico:

Questo tipo di pretrattamento fa uso di azioni fisiche per indebolire il campione. La macinatura è un esempio di trattamento meccanico. E' molto efficace ma costoso dal punto di vista energetico. Però se allo sfibramento fisico del materiale si accoppia l'idrolisi dei legami chimici, che può essere ottenuto tramite riscaldamento alla presenza di acqua, ne risulta un'azione sinergica molto efficace (Wang et al,2011). Questo tipo di pretrattamento viene chiamato TERMO-MECCANICO. Purtroppo il processo non è selettivo ed insieme alla scissione dei

legami chimici che porterebbero alla semplice idrolisi avvengono reazioni indesiderate, come la pirolisi, che abbassano le rese di processo (Schultz-Jensen N. et al. 2013). Può essere abbiamo con flusso di ossigeno (Bjerre et al., 1996). Inoltre si generano sostanze inibitorie per i successivi stadi di bioconversione. Infatti è stato dimostrato in letteratura che queste sostanze influenzano in negativo l'azione dei lieviti, essendo nocive per quest' ultimi (Schultz-Jensen N. et al. 2013). Pertanto dopo il pretrattamento termo-meccanico, si deve eliminare queste sostanze tramite un processo chiamato DETOSSIFICAZIONE. Le sostanze suddette sono acido formico, furfurale, idrossimetil furfurale e benzaldeide (Thomsen Et al., 2009). Esse sono generalmente dell' ordine di poche percentuali in peso rispetto al prodotto e sono volatili. Finora i metodi di rimozione di detossificazione del materiale esploso prevedevano il lavaggio con acqua essendo queste sostanze solubili in acqua. Però questo metodo provoca anche la perdita di una piccola quantità di oligomeri solubili che accrescerebbero la resa etanolica finale (Schultz-Jensen N. et al. 2013). Recentemente è nato uno studio, condotto dal Centro Enea, che svia questo problema attraverso uno strippaggio del materiale pretrattato, con l'uso di aria e vapore che consente di allontanare selettivamente gli inibitori, essendo questi volatili (Esmeralda et al. , 2001). Inoltre, sempre da uno studio condotto dal Centro Enea, è stato attivato un impianto pilota di STEAM EXPLOSION (Esmeralda et al. , 2001). Il trattamento consiste nell'uso di vapore saturo ad alta pressione per riscaldare rapidamente la biomassa che è mantenuta ad una temperatura compresa tra 180 e 220 °C per un massimo di dieci minuti e successivamente la pressione viene riportata a livello di quella atmosferica realizzando una decompressione esplosiva che sfibra ulteriormente la biomassa e rendendola immediatamente pronta per l'utilizzo per la produzione di bioetanolo mediante processi di idrolisi della cellulosa e fermentazione alcolica (Esmeralda et al., 2001). L' innovazione principale di tale procedimento è l' utilizzo di un reattore che permette di lavorare in continuo.

Nel nostro lavoro abbiamo utilizzato un autoclave. Prima ancora di tale pretrattamento, essendo le alghe organismi prelevati da un ambiente salato come la

laguna salmastra di Orbetello, abbiamo condotto una serie di lavaggi sotto acqua corrente e infine distillata per togliere il cloruro di sodio, che, da riscontri in letteratura, è risultato essere nocivo nei confronti dell'enzima e soprattutto del lievito (Schultz-Jensen N. et al. 2013). Una volta ottenuta con sicurezza che le alghe fossero prive di sale, facendo prove di precipitazione con nitrato di argento (che col cloruro di sodio in soluzione alcalina dà un precipitato di colorazione biancastra), si procede a riessicare il tutto in un forno alla temperatura di 40 gradi per 48 ore. Una volta stabilito che l'essiccato non contenesse acqua, osservando che il peso del materiale non diminuiva più, si macina il tutto attraverso un mortaio, cercando di ottenere una grandezza del macinato il più possibile omogenea. Dalla letteratura si è convenuto che la grandezza più efficace del macinato sia 2mm poiché oltre tali grandezze si sarebbe ottenuto un lievissimo miglioramento nella resa finale usando però un processo di macinazione troppo dispendioso economicamente (Schultz-Jensen N. et al. 2013).



Figura 2: *Macinazione della biomassa seccata tramite utilizzo di mortaio in metallo.*

2.1.2 L'AUTOCLAVE

Con il termine autoclave si definisce un recipiente adatto a contenere liquidi o gas, dotato di chiusura ermetica perché l'ambiente interno è destinato ad avere una pressione maggiore di quella esterna. Ha forma cilindrica con le basi concave ed è di metallo con l'interno rivestito di particolari materiali che lo tutelano dall'eventuale attacco chimico delle sostanze contenute. La chiusura è realizzata in modo tale che la differenza di pressione fra interno ed esterno contribuisca a mantenere la tenuta, agendo sopra una piastra di dimensioni di poco superiori all'apertura e che aderisca a essa occludendola. La tenuta viene anche assicurata mediante apposite guarnizioni di piombo o di materiale tessile. E' in genere dotata di strumenti per il controllo della pressione e della temperatura, e normalmente è munita di una valvola di sicurezza contro le sovrappressioni. La sua capacità può variare da pochi litri a qualche centinaio di metri cubici. Come materiali si impiegano soprattutto gli acciai al carbonio e, in qualche caso, anche l'alluminio. Poco frequente, al contrario, è l'impiego della ghisa.

Le autoclavi hanno diverse applicazioni che riguardano per esempio la conduzione di reazioni chimiche che richiedono elevate pressioni. Ma soprattutto trovano impiego nelle attività che riguardano processi di sterilizzazione di strumenti o prodotti alimentari, la vulcanizzazione della gomma, l'estrazione di gelatina dalle ossa o molto altro. Quando è necessario raffreddare o riscaldare le sostanze contenute nell'autoclave, si procede facendo circolare rispettivamente un liquido refrigerante o vapore in un serpentino fissato all'interno o in una camicia esterna. Le autoclavi possono essere corredate di agitatore.

L'autoclave in dotazione presenta al suo interno un ulteriore contenitore in teflon al fine di evitare che sulle pareti metalliche si verifichi l'attacco chimico delle sostanze inserite. Inoltre non possiede nessun impianto refrigerante e la temperatura è rilevata grazie ad una termocoppia (per termocoppia si intende un trasduttore di temperatura il cui funzionamento è basato sull'effetto termoelettrico). Inoltre l'autoclave in dotazione non è dotata di agitatore

magnetico, ma questo problema è stato ovviato disponendo sotto l'autoclave una piastra oscillante che garantisca anche un flusso di calore più uniforme visto che l'involucro esterno col compito di riscaldare l'autoclave non risponde molto bene agli input datogli dal sistema di controllo. Inoltre l'autoclave è predisposta per l'inserimento di un gas, quale ossigeno o azoto per esempio. La capienza massima è di un 1,5 litri e può raggiungere pressioni fino a 140 bar.

Dopo il processo in autoclave il materiale trattato è stato diviso in due parti. Una parte non ha subito altri processi di pretrattamento, mentre l'altra ha subito una detossificazione, ovvero una serie di filtrazioni con acqua distillata a 60 gradi per eliminare eventuali presenze di sostanze nocive prodotte durante il trattamento termo-meccanico. Seguendo le esperienze in letteratura le sostanze suddette sono acido formico, furfurale, idrossimetil furfurale e benzaldeide, tutte eliminabili attraverso la filtrazione con acqua su filtro WHATMAN 4 (Schultz-Jensen N. et al. 2013). Nella discussione finale osserveremo se questo ulteriore passaggio sarà effettivamente servito per ottenere una resa migliore.



Figura 3: *Strumentazione autoclave. A sinistra controller digitale per temperatura contrallata tramite uso di una termocoppia. A destra autoclave dentro camicia esterna riscaldante disposta sopra piastra oscillante.*

2.1.3 IDROLISI ENZIMATICA

Con l'idrolisi enzimatica della cellulasi si degrada la cellulosa fino ad arrivare al glucosio. Per idrolisi si intende quel complesso di reazioni chimiche in cui le molecole sono scisse in due o più parti per effetto dell'acqua. La cellulosa è un omopolimero formato da numerose molecole di glucosio legate tra loro da legami glicosidici $\beta(1\rightarrow4)$. Questo tipo di legame che, a differenza dell'amido, ha una conformazione "beta", fa sì che la cellulosa non sia digeribile dagli enzimi presenti nella maggior parte degli animali. Anche l'uomo non può utilizzare la cellulosa come molecola energetica poiché non ha enzimi capaci di idrolizzare quest'ultima in glucosio. L'enzima capace di demolire la cellulosa è chiamato cellulasi ed è presente solo in alcuni batteri. Alcuni animali, riescono a digerire la cellulosa e a utilizzarla come riserva energetica grazie al lavoro di questi batteri. I ruminanti si affidano a questi batteri presenti nei loro stomaci per idrolizzare la cellulosa in unità di glucosio.

Pertanto gli enzimi cellulasi sono una famiglia di enzimi, prodotti principalmente da funghi, batteri e protozoi che appartengono alla famiglia delle idrolasi e che catalizzano l'idrolisi dei legami 1,4- β -D glicosidici nella cellulosa, lichenina e dei β -D-glucani dei cereali. In base al tipo di reazione catalizzata si distinguono cinque classi di cellulasi. L'azione in sequenza di essi porta alla degradazione del polisaccaride in subunità semplici di glucosio (Drissen, 2007). La cellulosa esiste in forma di catene fortemente associate tra loro mediante molti legami idrogeno; la endocellulasi rompe i legami di questa struttura cristallina esponendo le singole catene. La esocellulasi preleva, per idrolisi, da due a quattro unità dalle estremità delle catene prodotte dando luogo a tetrasaccaridi, trisaccaridi (celletriosio) o disaccaridi (cellobosio). Ci sono due principali tipi di esocellulasi (o cellobioidrolasi): un tipo che opera sull'estremità riducente, l'altro sull'estremità non riducente della catena. Successivamente la cellobiasi (o beta glucosidasi)

idrolizza i prodotti dell'enzima precedente formando singoli monosaccaridi di glucosio. Vi sono inoltre cellulasi ossidative, come la cellobiosio deidrogenasi, che depolimerizzano la cellulosa con una reazione radicalica. Oppure la cellulasi fosforillasi che depolimerizza il polisaccaride per fosforolisi anzichè idrolisi.

Il glucosio prodotto però è un inibitore dell' enzima e man mano che ne aumenta la concentrazione l'enzima lavora sempre peggio (Philippidis et al., 1992). Ciò influisce sulla resa finale che risulterà inferiore rispetto a quella teorica. In seguito verrà spiegato come ovviare a questo problema.

L'enzima usato nell'esperienza è la cellulasi di *Aspergillus niger*. Essa catalizza tramite l'idrolisi dei legami endo-1,4-beta-D-glicosidici nella cellulosa, lichenina, glucano di orzo e i cello-oligosaccaridi da cellotriosi a celloesosi. Questo enzima idrolizza anche glicosamminoglicani intatti da un peptide core, ovvero da una catena peptidica a cui è legato, idrolizzando il legame xylosyl serina. Tutto ciò è riportato dalla casa di produzione. Un grande vantaggio è il costo relativamente basso rispetto ad altre cellulasi e come enzima pilota va più che bene poiché è stato verificato che anche un tale enzima produce in piccole quantità glucosio (Drissen , 2007)

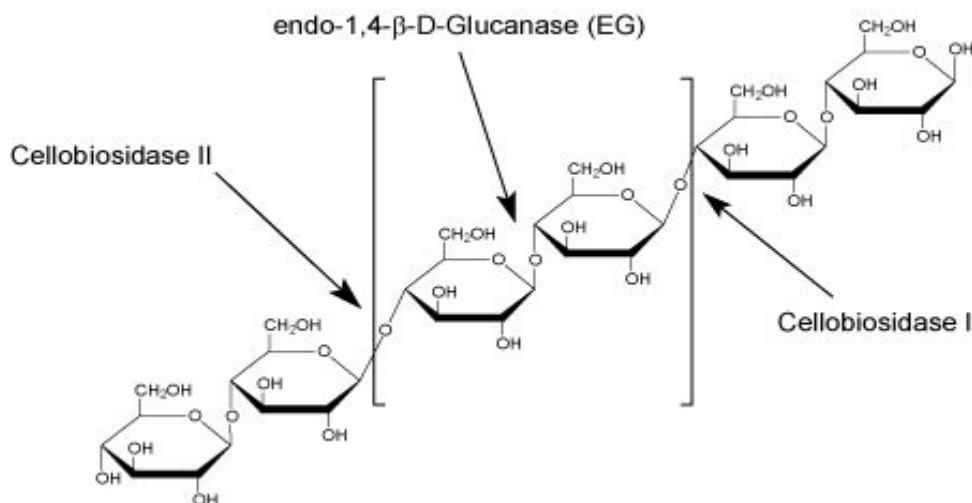


Figura 4: Catena di cellulosa. Legami spezzati dalla catalisi dell' enzima cellulasi.

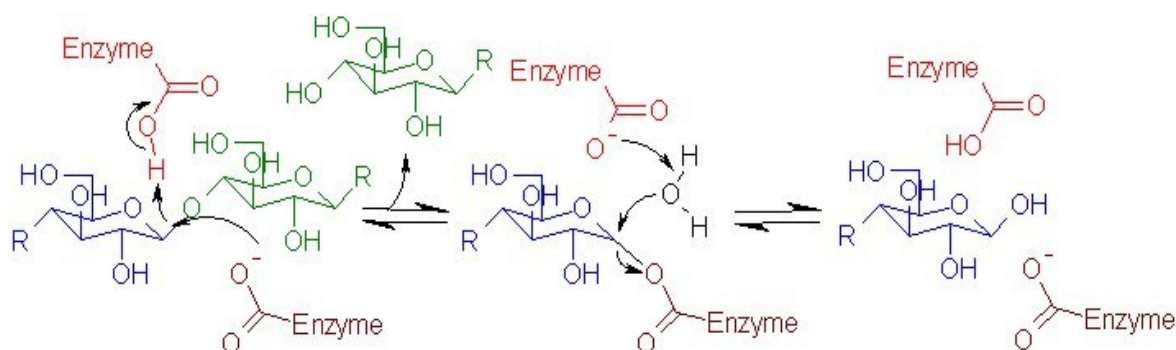


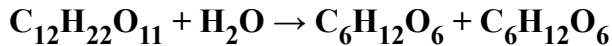
Figura 4.1: *Dettaglio attacco enzima nella degradazione del cellobiosio in due glucosio.*

2.1.4 LA FERMENTAZIONE

La fermentazione alcolica è ottenuta tramite l'uso di lieviti, quindi non è necessario l'uso di nessun "chemicals" se non i nutrienti del lievito per una fase iniziale. Essa è una forma di metabolismo energetico che avviene in alcuni lieviti in assenza di ossigeno, o come nel caso del lievito utilizzato, il *Saccharomyces cerevisiae*, anche in presenza di ossigeno. Infatti esso è un anaerobio facoltativo.

In generale il processo di fermentazione si articola in due fasi: nella prima fase il lievito scinde, tramite l'enzima invertasi, gli zuccheri complessi (disaccaridi, come il saccarosio), mentre nella seconda avviene la trasformazione del glucosio (nel nostro caso) in etanolo.

La reazione che caratterizza la prima fase è la seguente e si ottiene la formazione di glucosio e fruttosio:



Però il nostro lievito, il *Saccharomyces cerevisiae* non riesce a scindere il cellobiosio in due molecole di glucosio. Nella seconda fase, il glucosio viene degradato dal lievito con la glicolisi per ottenere energia:



Ma poichè si va in condizione di anaerobiosi, ottenuto tramite sigillamento dell'ambiente di reazione, l'assenza di ossigeno impedisce poi il verificarsi del normale ciclo di Krebs e della respirazione cellulare aerobica che indirettamente rigenererebbero NAD^+ , indispensabile per la glicolisi di altro glucosio. Per questo motivo la cellula passa ai processi della fermentazione. Infatti come abbiamo detto la mancanza di ossigeno impedisce alla cellula di sfruttare a fondo l'energia liberata dalla degradazione del glucosio, in quanto non è in grado di avviare processi di respirazione aerobia. La cellula non può quindi ottenere le molecole di ATP che è in grado di produrre con il ciclo di krebs. Però la cellula ha bisogno di produrre ATP per soddisfare il suo fabbisogno energetico. Per questo motivo dovrà continuare a produrlo per la propria sopravvivenza energetica, trovando il modo di ossidare i due NADH prodotti. La cellula necessita allora di cofattori ossidati NAD^+ in grado di ossidare il substrato e continuare la glicolisi. Per questo motivo gli elettroni del NADH vengono ceduti al piruvato, che ossida il NADH, riducendosi. A questo punto il destino delle due molecole di piruvato diventa determinante e può essere trasformato tramite due vie: la fermentazione lattica e la fermentazione alcolica. Nel nostro caso si ha la fermentazione alcolica. La reazione consiste in due passaggi, catalizzati da altrettanti enzimi. L'enzima chiamato piruvato decarbossilasi (PDC) libera una molecola di anidride carbonica dal piruvato con

un processo chiamato decarbossilazione e ottenendo acetaldeide. Quest'ultima viene ridotta a etanolo dall'enzima alcol deidrogenasi (ADH), il quale utilizza come cofattore il NADH ossidandolo nuovamente a NAD^+ e rendendolo nuovamente disponibile per la glicolisi. Pertanto la molecola è riuscita ad ottenere in condizione di anaerobiosi tutti i reagenti atti a condurre nuovamente la glicolisi per produrre energia.

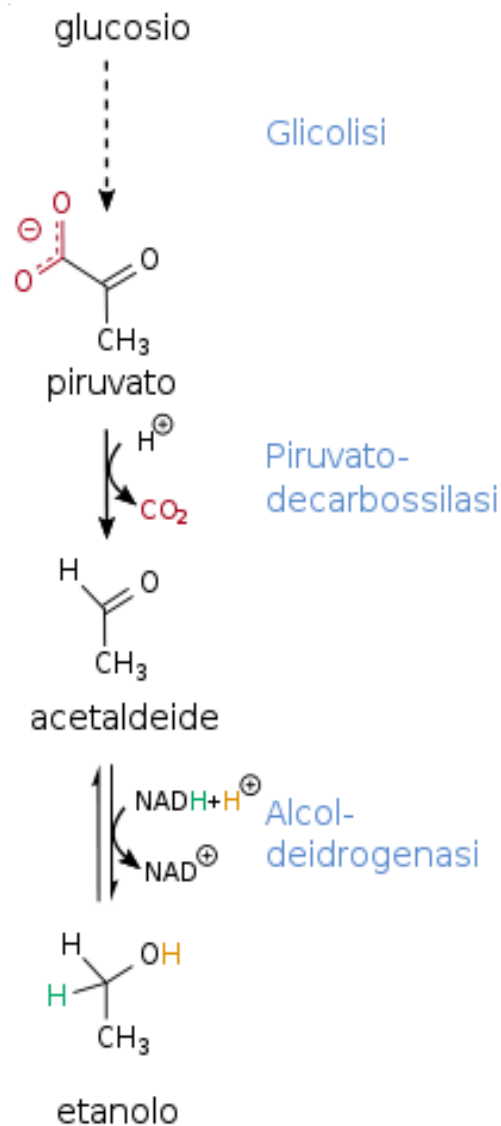


Figura 5: Reazioni fermentazione alcolica condotte dal lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Dal piruvato all'etanolo tramite la piruvato decarbossilasi e l'alcol deidrogenasi.

Invece, in presenza o meno di ossigeno, il *Saccharomyces cerevisiae* fermenta anche mediante la fermentazione malo-alcolica, al contrario di quanto avviene per altri lieviti che, in presenza di ossigeno, respirano.

La formula generale che sintetizza la formazione di etanolo e anidride carbonica a partire dal glucosio è quella del chimico-fisico francese J. L. Gay-Lussac:



Pertanto da a ogni molecola di glucosio, sono prodotte due molecole di etanolo e due di anidride carbonica. La resa di etanolo calcolato in peso molecolare corrisponde al 51% del peso del glucosio impiegato. Come nel caso degli enzimi anche qui abbiamo un effetto di inibizione del prodotto sul lievito. Il *Saccharomyces* è però ben tollerante all'etanolo, e alcuni ceppi riescono a produrre etanolo da glucosio fino a concentrazioni di 300 g/L (Esmeralda et al., 2001), concentrazioni che sono molto maggiori di quello che ci aspettiamo di avere. Per questo motivo il fattore inibitorio discusso può essere considerato nullo. Per la nostra preparazione è stato impiegato un ceppo commerciale di *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 DETERMINAZIONE GLUCOSIO ED ETANOLO

Per la determinazione del glucosio ed etanolo si è fatto ricorso alla via spettrofotometrica UV-VISIBILE. Si è potuto usare questa via analitica grazie all'utilizzo di kit appositi alla determinazione di queste due molecole per via

spettrofotometrica poichè nelle normali condizioni non potrebbero essere viste essendo trasparenti a lunghezze d'onda del visibile e dell' ultravioletto.

2.2.1 LO SPETTROFOTOMETRO UV-VISIBILE

Tali spettroscopie sono utilizzate come strumenti analitici indispensabili per la determinazione dei composti chimici e dei loro gruppi funzionali. La condizione è che l' analita non sia completamente trasparente alla radiazione incidente. Se questa condizione si verifica, si otterranno degli assorbimenti e quindi delle transizioni tra livelli energetici elettronici. La spettrofotometria di assorbimento UV-VISIBILE lavora con radiazioni luminose della regione dello spettro elettromagnetico appartenenti al campo del visibile (350 – 700 nm) e del vicino ultravioletto (200 – 350 nm). Quando un fotone ultravioletto o visibile viene assorbito dalla molecola, vi è una transizione dallo stato elettronico fondamentale ad uno eccitato. Lo spettro registrato sarà caratterizzato da una serie di picchi con altezza variabile per ciascuna transizione, in relazione all'intensità dell'assorbimento(Cozzi et al, 2006) Tramite l' analisi dello spettro possiamo sia condurre un' analisi qualitativa, volta a determinare le caratteristiche delle molecola, sia quantitativa , volta a determinare la concentrazione di un determinato analita.

- ANALISI QUALITATIVA:

Per condurre un' analisi qualitativa si utilizza raggi policromatici a spettro continuo, successivamente separati tramite monocromatori in radiazioni ad una determinata lunghezza d'onda. Le singole radiazioni monocromatiche vengono fatte passare sequenzialmente attraverso la sostanza in esame, che assorbirà in

modo diverso le diverse radiazioni. Analizzando i valori registrati in un grafico lunghezza d'onda-assorbimento, si ottiene lo spettro di assorbimento della sostanza(Cozzi et al, 2006). Ogni sostanza ha il suo spettro di assorbimento. Pertanto tali spettri permettono di identificare una sostanza tramite l'utilizzo di campioni noti o banche dati di spettri, poichè eseguendo una scansione di assorbanze in funzione delle lunghezze d'onda si confronta la posizione dei massimi con quella degli spettri di campioni noti(Cozzi et al, 2006).

- ANALISI QUANTITATIVA:

Per un' analisi quantitativa si utilizza radiazioni di una sola lunghezza d'onda, ottenuti grazie all'utilizzo di filtri appositi che selezionano solo radiazioni con una determinata lunghezza d'onda(Cozzi et al, 2006). Il principio sta nel fatto che quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione dell'analita che si sta studiando. Infatti l'assorbimento dipende dalla concentrazione ed esiste una legge matematica che descrive tale fenomeno che ci permette di calcolare la concentrazione di campione entro determinati limiti(Cozzi et al, 2006).

legge di Lambert – Beer:

$$A = \epsilon c d$$

dove:

A = assorbanza del campione

ϵ = coefficiente di estinzione molare, specifico per ogni sostanza

d = cammino ottico (cm)

c = concentrazioni (mol/l)

Secondo tale legge l'assorbanza A è proporzionale sia alla concentrazione della sostanza assorbente, sia allo spessore dello strato attraversato. Nonostante ciò la dipendenza è regolata da alcuni fattori esterni racchiusi nel coefficiente di estinzione molare ϵ che dipende dalla lunghezza d'onda della radiazione assorbita, dalla natura del solvente, dal pH e dalla specie chimica che assorbe (Cozzi et al, 2006).

Per determinare quantitativamente un analita si deve impiegare il valore di lunghezza d'onda in cui ϵ presenta un massimo di assorbanza in modo da massimizzare la sensibilità (dA/dC) e da minimizzare l'errore ($dA/d\lambda$) della misura (Cozzi et al, 2006). Lo spettro pertanto diventa essenziale per la scelta della lunghezza d'onda più giusta da usare. La scelta più accurata da fare diventa una λ_{max} di un cromoforo caratteristico della molecola. Per questi motivi si sceglierà in modo che:

- l'assorbimento sia massimo → per motivi di sensibilità: se l'assorbimento è alto è possibile rilevare quantità piccolissime di sostanza.
- sia al centro di un picco 'largo' → per motivi di precisione, in modo che piccole variazioni di lunghezza d'onda comportino errori minimi sulla misura dell'assorbanza.

Uno spettrofotometro UV-Vis si può schematicamente suddividere nei seguenti componenti principali:

- sorgente di energia radiante nello spettro UV-visibile.
- monocromatore, il cui scopo è quello di isolare un intervallo il più possibile ristretto di radiazioni emesse centrato nella lunghezza d'onda d'interesse.
- recipiente del campione, chiamato cuvetta, che deve essere trasparente all'energia radiante.
- rivelatore, che può sfruttare diversi principi fisici.

La difficoltà sta nel fatto che per ogni misura, si deve ripetere l'azzeramento contro il bianco, ovvero registrare prima lo spettro del bianco, poi lo spettro del campione ed infine sottrarre al secondo il primo. Inoltre nell'uso dello spettrofotometro bisogna tenere conto che la legge di Lambert-Beer è valida solo entro tali limiti di concentrazione. Infatti al crescere della concentrazione del soluto si verificano deviazioni notevoli che vanno a falsificare il dato analitico (Cozzi et al, 2006). Circa le cause che provocano queste deviazioni, l'ipotesi è quella che all'aumentare della concentrazione aumenta anche il numero di urti fra le particelle. Da questi urti vanno a formarsi molecole o aggregati di particelle più complesse, diverse per struttura da quelle in esame. Per questo motivo, si fa uso di soluzioni diluite al massimo, ragionevolmente con la sensibilità dello strumento. E' da ricordare anche che all'aumentare della concentrazione si ha un aumento dell'indice di rifrazione e quindi una maggior dispersione del raggio nell'attraversare la soluzione stessa. Un'altra condizione di validità della legge di Lambert-Beer è che le radiazioni luminose, che devono attraversare la soluzione in esame, siano monocromatiche. In realtà le radiazioni impiegate non sono mai rigorosamente monocromatiche a causa, soprattutto, di difficoltà strumentali. Pertanto si cerca che la banda di lunghezza d'onda emessa sia la più ristretta possibile.

Lo spettrofotometro utilizzato è l' HITACHI model 200, PERKIN-ELMER. Come sorgenti è provvisto di due lampade, una al deuterio e una al tungsteno. La prima è una lampada a scarica. Lo spettro è prodotto da un arco che si forma mediante eccitazione elettrica del gas deuterio che riempie la lampada. Presenta un ampio spettro nella regione dell'UV. La seconda fa parte delle lampade a filo incandescente che rilascia uno spettro principalmente nel visibile. E' previsto un pulsante che aziona un meccanismo che fa passare soltanto radiazioni UV, da 190 a 370, o radiazioni visibili, da 370 a 900, con una slit che può essere selezionato da 0,2 a 4 nm.. La lunghezza d'onda viene selezionata grazie all'uso di un monocromatore. Inoltre lo spettrofotometro in dotazione è di tipo a doppio raggio. Pertanto il sistema invia un raggio verso il beam splitter che separa il raggio in due

raggi identici per frequenza e intensità, uno attraverso il campione e l'altro attraverso il bianco, per cui si ha un confronto continuo tra l'assorbanza del campione e quella del bianco. Il rivelatore è costituito da un fotodiodo.



Figura 6: immagine spettrofotometro HITACHI model 200, PERKIN-ELMER.

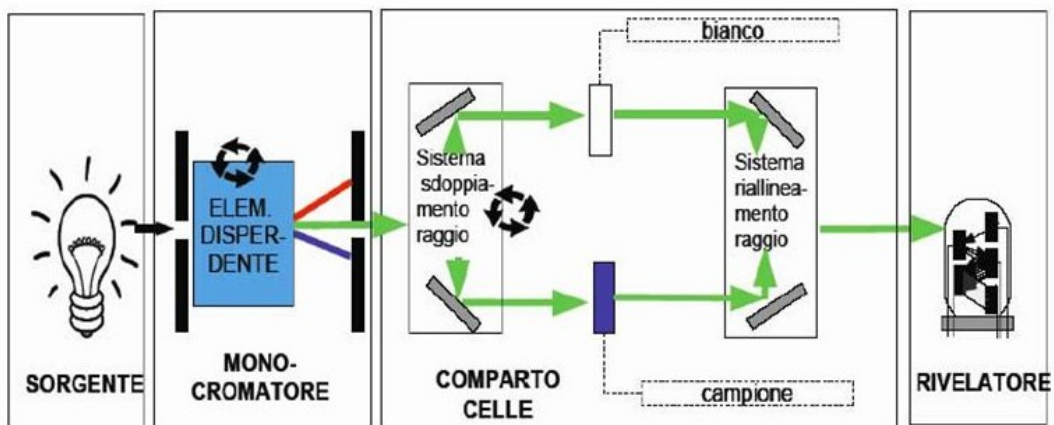
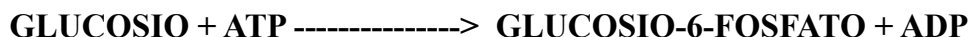


Figura 7: schema di uno spettrofotometro a doppio raggio diviso nelle varie componenti (sorgente, monocromatore, comparto celle, rivelatore).

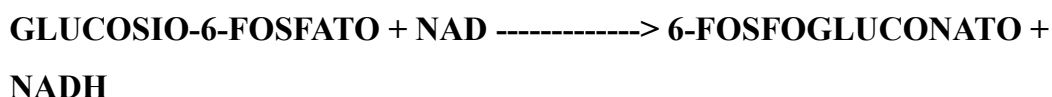
2.2.2 KIT GLUCOSIO

Il glucosio, per essere determinato analiticamente per via spettrofotometrica uv-visibile, necessita di un kit apposito poichè esso non risulta intergere con radiazioni uv-visibili. Attraverso l'uso del kit "Glucose (HK) Assay Kit", codice prodotto GAHK-20 e fornito dalla SIGMA-ALDRICH, è possibile determinare il glucosio prodotto attraverso la via spettrofotometrica. Il kit sfrutta l'azione di enzimi per trasformare il glucosio in un sottoprodotto analizzabile. L'uso degli enzimi, come strumenti analitici, ha trovato largo uso nell'industria alimentare, biochimica e farmaceutica. Questo perchè le reazioni enzimatiche sono molto specifiche, riproducibili e sensibili. Inoltre svolgono reazioni rapide e quindi sono perfette per l'uso di scopi analitici. Il kit usato è per la determinazione quantitativa di glucosio. Il glucosio viene fosforilato dall' adenosina trifosfato (ATP). La reazione viene catalizzata dalla esochinasi. Il prodotto che si ottiene è il glucosio-6-fosfato (G6P). Con una seconda reazione questo viene ossidato a 6-fosfo-gluconato in presenza di nicotinammide adenina dinucleotide ossidata (NAD) in una reazione catalizzata dalla glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH). Durante questa ossidazione, una quantità equimolare di NAD viene ridotto a NADH. Il conseguente aumento di assorbanza a 340 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio. A 340nm siamo nel range delle lunghezze dei raggi uv e quindi visualizzabile con un spettrofotometro uv-visibile. Pertanto con l'uso del kit utilizzato si va a vedere indirettamente la quantità di glucosio prodotto studiando il NADH che assorbe a 340nm.

esochinasi



G6PDH



2.2.2 KIT ETANOLO

Per quanto riguarda anche la determinazione di etanolo, è stato doveroso utilizzare un kit apposito, dato che anche esso non interagisce con le lunghezze d'onda dello spettrofotometro uv-visibile. Il kit utilizzato è "Ethanol Assay Kit", numero di catalogo MAK076, ed è sempre fornito dalla SIGMA-ALDRICH. Il kit, per motivi industriali, non menziona ne l'enzima ne le reazioni che portano alla determinazione dell'analita. Le uniche informazioni a disposizione sono che le reazioni sono catalizzate da un alcol ossidasi che ossida l'etanolo per generare perossido di idrogeno. Successivamente il perossido di idrogeno reagisce con il probe (MAK076B) per generare una molecola che assorbe a 570 nm di lunghezza d'onda. Studiando tale molecola si riesce a determinare la concentrazione di etanolo con lo stesso procedimento usato per il glucosio.

L'alcol ossidasi è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi che catalizza la reazione:



L'ossidasi è una flavoproteina (contiene il FAD); agisce lentamente sugli alcoli primari e sugli alcoli insaturi, mentre gli alcoli (a catena ramificata) e secondari non vengono attaccati.

2.3 IDROLISI E FERMENTAZIONE IN SIMULTANEA (SSF)

Nel corso dell'esperienza si è provato a condurre un esperimento che conciliasse il processo di idrolisi e di fermentazione. Tutto ciò per verificare un eventuale miglioramento sulla resa finale, rispetto alle esperienze condotte prima, dove l'idrolisi e la fermentazione non erano contemporanee (processo SHF, separate hydrolysis and fermentation). Questo nuovo processo viene indicato in letteratura come "processo SSF" (simultaneous saccharification and fermentation). Per condurre tale esperimento si è dovuto trovare condizioni e parametri del solvente che conciliassero e che non inibissero l'azione sia dell' enzima che del lievito. Per quanto riguarda il PH del solvente, si è notato che sia gli enzimi che il lievito hanno un campo di attività che si sovrappone tra pH 4 e 5, e quindi, per quanto riguarda questo parametro non ci sono problemi (Esmeralda et al. , 2001). Si è cercato pertanto di ottenere un PH che si aggirasse sul 4,8. La conduzione dell' esperimento con PH superiori o inferiori avrebbe condotto ad un fallimento essendo gli enzimi e lieviti denaturati a tali PH (Esmeralda et al. , 2001). Per quanto riguarda la temperatura per la quale si deve condurre il processo, la scelta del parametro ottimale è più difficile avendo il lievito e l'enzima temperature ottimali diverse dell'ordine delle decine di gradi. Infatti l'attività enzimatica aumenta con la temperatura fino ai 50-60°C (Esmeralda et al. , 2001). Oltre tale temperatura la loro attività inizia a decrescere in quanto cominciano a denaturarsi. Per quanto riguarda il lievito, però, le temperature ottimali sono notevolmente inferiori ed esso

non potrebbe sopravvivere alle temperature dell'enzima (Esmeralda et al. , 2001). Bisogna pertanto ricercare la massima temperatura in cui il lievito si mantiene produttivo e non deprime eccessivamente l'attività dell'enzima. E' stato convenuto, dopo alcuni osservazioni prese dalla letteratura, che per il lievito la temperatura limite sia 35 gradi centigradi (Schultz-Jensen N. et al. , 2013). Già a 37 gradi centigradi il lievito smette di lavorare. Poichè a 35 gradi centigradi siamo al limite superiore oltre il quale si ha una forte diminuzione di resa, è stato convenuto procedere con temperature leggermente inferiori a tale limite per non rischiare che l'inaffidibilità della stufa, in cui è stato condotto l'esperimento, provocasse piccole variazioni di temperatura che avrebbero derterminato un forte denaturamento del lievito se non la morte (Gonzalez et al, 1989). L'esperimento è stato pertanto condotto a 33 gradi centigradi.

Un ottimo vantaggio della procedura SSF è che se si procedesse con i due stadi separati, quello enzimatico e quello della fermentazione, ci si aspetterebbe che l'accumolo di glucosio nel primo stadio inibisse l' attività dello stesso enzima essendo il prodotto un suo inibente. Pertanto la conduzione dei due processi in contemporanea fa sì che il lievito trasforma man mano il glucosio prodotto per via enzimatica garantendo così una bassa concentrazione di glucosio che incide positivamente sulla produttività dell'enzima. Nell'esperienza per via SSF, la soluzione ottenuta dall'idrolisi è stata filtrata ed utilizzata per la fermentazione in beute da 300 mL, in cui sono stati introdotti 100 mL di idrolizzato, arricchito dei nutrienti e 3g/L di lievito.

2.4 DESCRIZIONE ESPERIENZA RIASSUNTIVA

Una volta deciso a tavolino tutti i parametri e le procedure da eseguire per condurre l'esperienza, come descritto nelle pagine precedenti, è stato semplice condurre tutte le varianti dell' esperimento tramite l'applicazione di una serie di

variazioni dei parametri descritti fino adesso. In totale sono stati condotti quattro diversi esperimenti. Tutto ciò è stato fatto per evidenziare le differenze in ognuna delle procedure eseguite, riscontrando i dati con la teoria già in parte esposta nei paragrafi precedenti.

- **FASE PRETRATTAMENTO**

La materia prima, l'alga *C. Linum*, si trovava già in uno stato anidro poiché prelevata dalla laguna di Orbetello due anni prima. Poiché non era stata lavata si è dovuto procedere ad un lavaggio sotto acqua del rubinetto e successivamente un secondo lavaggio con acqua deionizzata (è stata presa una quantità abbondante di materia prima sufficiente per condurre tutte le esperienze). Dopo il lavaggio, a cui è seguito il controllo con AgNO_3 per verificare l'assenza di NaCl , si è potuto procedere alla essiccazione della materia prima tramite l'utilizzo di una stufa a 40 gradi centigradi per 48 ore. Successivamente l'essiccato è stato macinato a mano tramite l'utilizzo di un macinino ed è stato verificato, tramite telescopio ottico, che il macinato avesse dimensioni medie di 2mm.

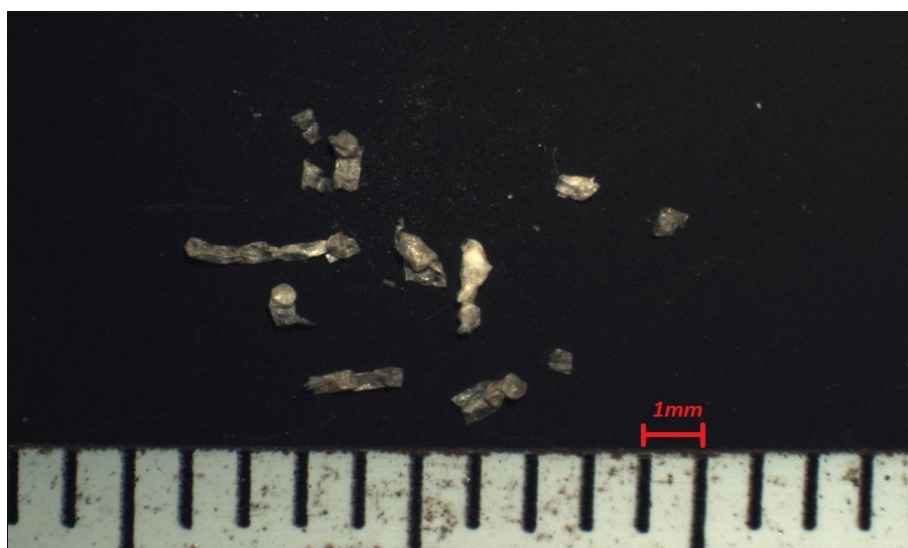


Figura 8: Immagine dimensioni macinato della biomassa secca tramite utilizzo di microscopio ottico.

A questo punto l'esperienza si divide in 4 sottoesperienze che verranno denominate esperienza 1, 2, 3 e 4. Del macinato sono state prese 4 aliquote da 5 grammi. Tre delle quali sono state condotte ad un successivo processo di pretrattamento condotto in autoclave. La quarta aliquota invece non ha avuto altri pretrattamenti. Del processo in autoclave, essendo il macchinario non molto stabile alle alte temperature e non raggiungendo sempre la stessa temperatura agli input selezionati, si è ottenuto delle piccole variazioni della temperatura e tempo di stazionamento a tale temperatura per le tre diverse aliquote. Dopo il trattamento in autoclave il materiale trattato è stato essiccato nuovamente.

Pretrattamento in autoclave	ALIQUOTA 1	ALIQUOTA 2	ALIQUOTA 3
TEMPERATURA (gradi centigradi)	200	197	203
PERMANENZA (minuti)	9	10	12
PRESSIONE (bar)	15,5	14,7	16,4
GRAMMI FINALI (dopo essiccamento)	2,09	2,14	2,07

Figura 9: *Tabella di tre esperienze in autoclave con relativi parametri di temperatura massima, tempo di permanenza alla temperatura massima, pressione massima raggiunta e grammi finali post pretrattamento.*

Per non falsificare la resa di ogni variante sperimentale è stato convenuto mescolare nuovamente le tre aliquote che avevano subito delle piccole variazioni dei parametri in autoclave, quali temperatura massima, pressione e permanenza a temperatura massima, e che potevano risultare determinanti sulla resa finale di ogni esperimento, invalidando così la creazione di questi per verificare le differenze. Si è convenuto pertanto ad un pareggiamento delle condizioni iniziali rimescolando i tre prodotti trattati in autoclave e ottenendo una media pesata corrispondente a 2,1g per aliquota.

- **TRATTAZIONE SHF**

A questo punto si è potuto iniziare con le prime due varianti dell'esperimento riguardanti il procedimento enzimatico e di fermentazione condotti separatamente. Entrambi i processi, sia con enzima che con lievito, sono stati condotti per due giorni rispettivamente. L'unica variante fra i due processi è che la prima aliquota non aveva subito filtrazione dopo il trattamento termo-meccanico, mentre la seconda aveva subito un processo di filtrazione, su filtro WHATMAN 4, due volte con acqua calda deionizzata a 60 gradi centigradi. In questo caso poiché il processo enzimatico era separato dalla fermentazione si è potuto condurre il primo ad una temperatura di 40 gradi centigradi per poi scendere a 33 gradi centigradi per la fermentazione. Come ambiente è stata scelta una soluzione tampone di acido acetico/acetato di sodio ottenendo per l'esperienza 1 un PH di 4,79 mentre per l'esperienza 2 un PH di 4,75. Entrambe portate complessivamente ad un volume di 120ml in beute da 250ml. L'esperimento è stato condotto in una stufa. I prelievi dei campioni da analizzare per la determinazione di glucosio e etanolo venivano eseguiti due volte al giorno. Le soluzioni sono state agitate periodicamente per consentire una condizione omogenea visto l'impossibilità di tenerle sotto agitazione continua. Per la fase enzimatica è stato inserito 0,2g di enzima, mentre per la fase successiva 0,125g di lievito e 0,125g di nutrienti per il lievito (per

entrambe le esperienze). La durata complessiva delle due esperienze è stata di 4 giorni.

Tempo di reazione	96 ore
Rapporto biomassa/ fase liquida	4%
Volume fase liquida	120ml
Rapporto enzima/biomassa	4%
Rapporto lievito/biomassa	2,5%
temperatura	40°C /33°C
PH	4,7

- **TRATTAZIONE SSF**

Alla fine del processo enzimatico delle esperienze 1 e 2 sono state inserite anche le altre due varianti che prevedevano il processo SSF. L'esperienza 3 prevede l'utilizzo di materia prima che aveva subito il pretrattamento sotto autoclave e successivamente filtrato, mentre l'esperienza 4 prevedeva l'uso della materia prima che si era fermata alla macinazione senza il pretrattamento sotto autoclave. Anche le esperienze 3 e 4 sono state portate sotto una soluzione di 120ml in beute da 250ml e con soluzione tampone di acido acetico/acetato di sodio con un PH per l'aliquota 3 di 4,76 e per l'aliquota 4 di 4,81. La temperatura con cui sono state condotte le due esperienze in SSF è 33 gradi centigradi. L'esperimento è stato condotto in una stufa. I prelievi dei campioni da analizzare per la determinazione di glucosio e etanolo venivano eseguiti due volte al giorno. Per l'esperienza 4 si è dovuto passare da 5g ai 2,1g delle altre per ottenere un pareggiamento nella determinazione della resa finale relativa. Le soluzioni sono state agitate periodicamente per consentire una condizione omogenea visto l'impossibilità di tenerle sotto agitazione continua. Per la fase enzimatica è stato inserito 0,2g di

enzima per l'esperienza 3, 0,08g per la 4, mentre per la fase di fermentazione 0,125g di lievito e 0,125g di nutrienti per il lievito per l'esperienza 3, 0,05g di lievito e 0,05g di nutrienti per l'esperienza 4. La durata complessiva delle due esperienze è stata di 2 giorni.

Tempo di reazione	48 ore
Rapporto biomassa/ fase liquida	4%
Volume fase liquida	120ml
Rapporto enzima/biomassa	4%
Rapporto lievito/biomassa	2,5%
temperatura	33°C
PH	4,8

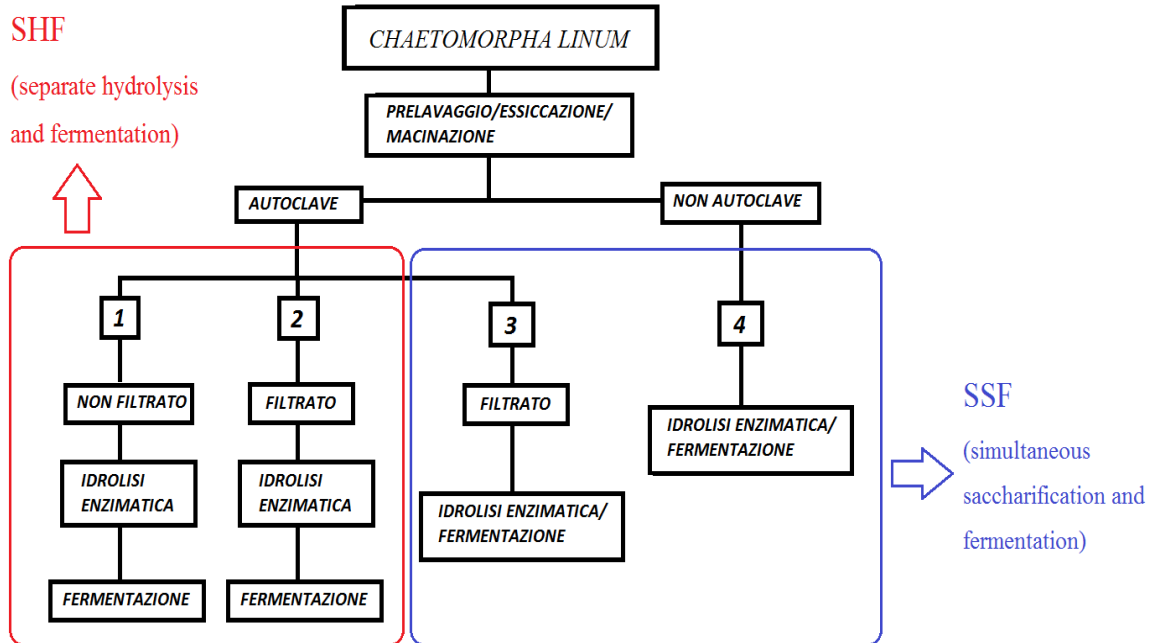


Figura 10: Schema riassuntivo delle esperienze in laboratorio.

CAPITOLO 3

DISCUSSIONE RISULTATI

Con l'utilizzo dello spettrofotometro e dei kit appositi si è potuto determinare le rese finali di glucosio ed etanolo per ciascun dei quattro esperimenti.

Preventivamente si può affermare che, con i dati ottenuti, sia l'enzima che il lievito hanno lavorato senza che eventuali errori di procedimento, quali erroneo utilizzo di acidità del solvente o erronea temperatura di stazionamento, inquinanti chimici o batterici presenti nell'alga, inibissero completamente la loro azione.

3.1 RESA GLUCOSIO

Dalla letteratura si evince che la *C. linum* possiede più glucano rispetto alla media delle altre alghe. Precisamente, sempre da studi effettuati in precedenza, è risultato che la *C. linum* possiede una quota di glucano che corrisponde a 36 grammi su 100 grammi di materia secca complessivi (Schultz-Jensen N. et al., 2013). Pertanto risulta semplice formulare la resa teorica di glucosio prodotto dal glucano che corrisponderà a 36 grammi su 100 grammi. Poiché negli esperimenti sono stati usati 5 grammi di materia organica secca, si deduce che la resa teorica di ogni esperienza sarà di 1,8 grammi di glucosio. Per quanto riguarda la quarta esperienza, dove si è utilizzato 2,1 grammi di materiale non trattato in autoclave, si dovrà moltiplicare per 2,38 volte la resa finale poiché non essendo stata trattata in autoclave, essa non ha perso parte del peso in soluzione.

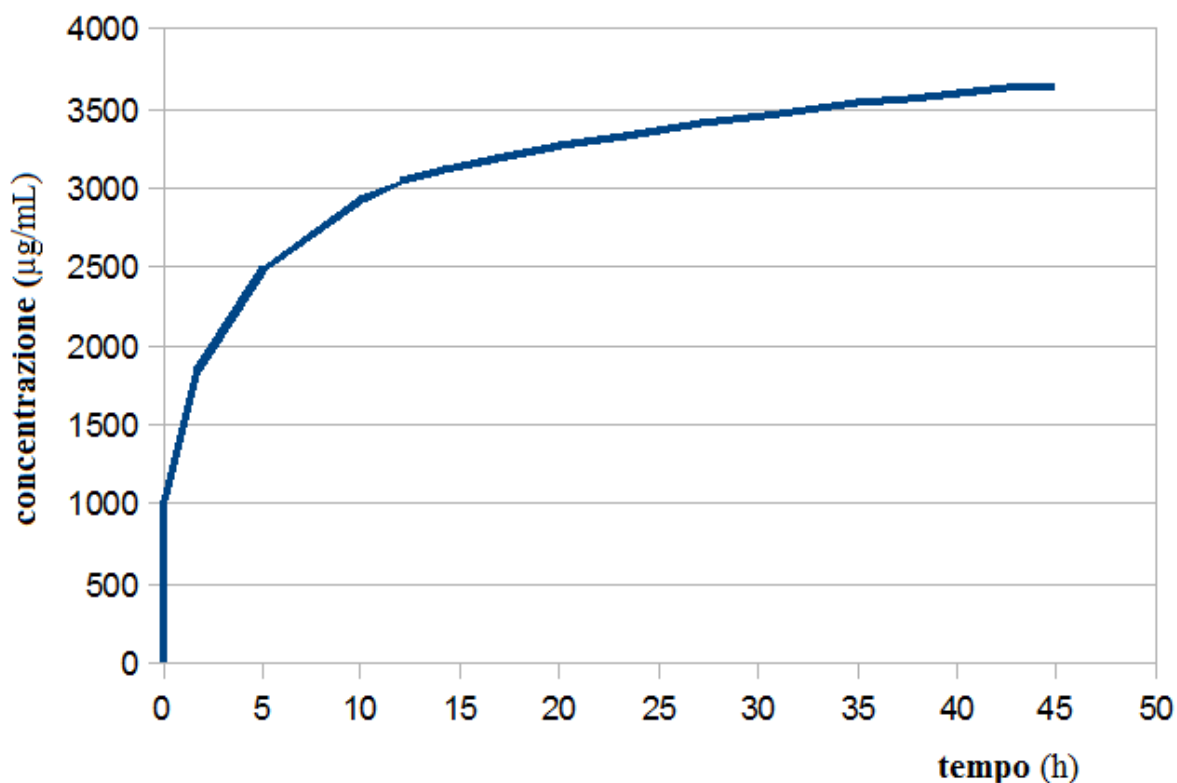
◦ Esperienza 1

Figura 11: *Diagramma andamento produzione glucosio riguardante prima esperienza*

Dal grafico della prima esperienza si può notare come la produzione di glucosio sia più del doppio rispetto alle altre. La concentrazione si è stabilizzata sui 3560 µg/mL che corrispondono a 0,48g finali di glucosio. L'azione dell'enzima può considerarsi conclusa già dopo 24 ore avendo ottenuto una resa relativa del 95%. La resa assoluta è stata del 26,7% rispetto a quella teorica. La bassa resa è da imputare all'enzima pilota utilizzato. Infatti l'uso di un enzima dotato di un'azione idrolitica generale nei confronti della cellulosa, senza l'uso in concomitanza di un enzima più specifico all'azione idrolitica β -glucosidasi, fa sì che solo una piccola parte della cellulosa venga trasformata in glucosio. Un altro fattore che potrebbe aver inciso

minimamente sulla resa finale in maniera negativa dovrebbe essere una eccessiva pirolisi della cellulosa dovuta alle temperature troppo elevate durante il pretrattamento in autoclave. Inoltre quest'ultimo trattamento potrebbe non aver disgregato a sufficienza la cellulosa, andando a peggiorare l'attività dell'enzima su di essa. Nonostante tutto era stato già considerato il raggiungimento di una resa bassa a causa dell' enzima pilota utilizzato.

◦ Esperienza 2

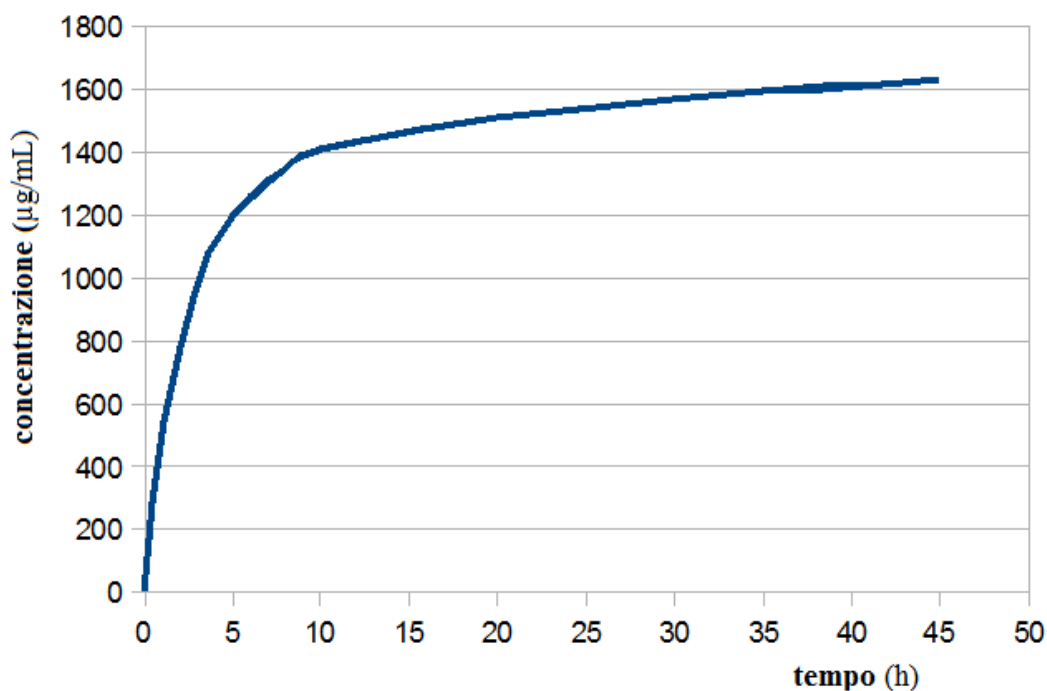


Figura 12: *Diagramma andamento produzione glucosio riguardante seconda esperienza.*

Dal grafico della seconda esperienza si può notare che la concentrazione finale di glucosio sia notevolmente inferiore rispetto a quella della prima esperienza. La concentrazione finale è di 1610 µg/mL che corrispondono a 0,19g di glucosio. L'

azione dell'enzima può considerarsi conclusa già dopo 24 ore avendo ottenuto una resa relativa del 95% . Rispetto alla resa teorica si è ottenuto solo il 10,6%. Questa notevole diminuzione rispetto alla prima esperienza è da ricercare nella filtrazione compiuta dopo il processo in autoclave. Infatti con l'azione dell'autoclave parte della cellulosa finisce in soluzione e con la filtrazione, eseguita per togliere alcuni interferenti del lievito, vengono filtrate anche alcune componenti della cellulosa che era finita in soluzione. Pertanto si può affermare che la filtrazione porta più svantaggi che vantaggi. Calcolando la differenza fra la resa della prima esperienza con quella della seconda si può dedurre che la cellulosa (trasformata in glucosio), che finisce in soluzione grazie al trattamento termo-meccanico in autoclave alla temperatura di 200 gradi, è 0,29g. Il che equivale a dire che l'azione termo-meccanica porta in soluzione circa il 16,1% di glucano trasformato in glucosio.

○ Esperienza 3 e 4

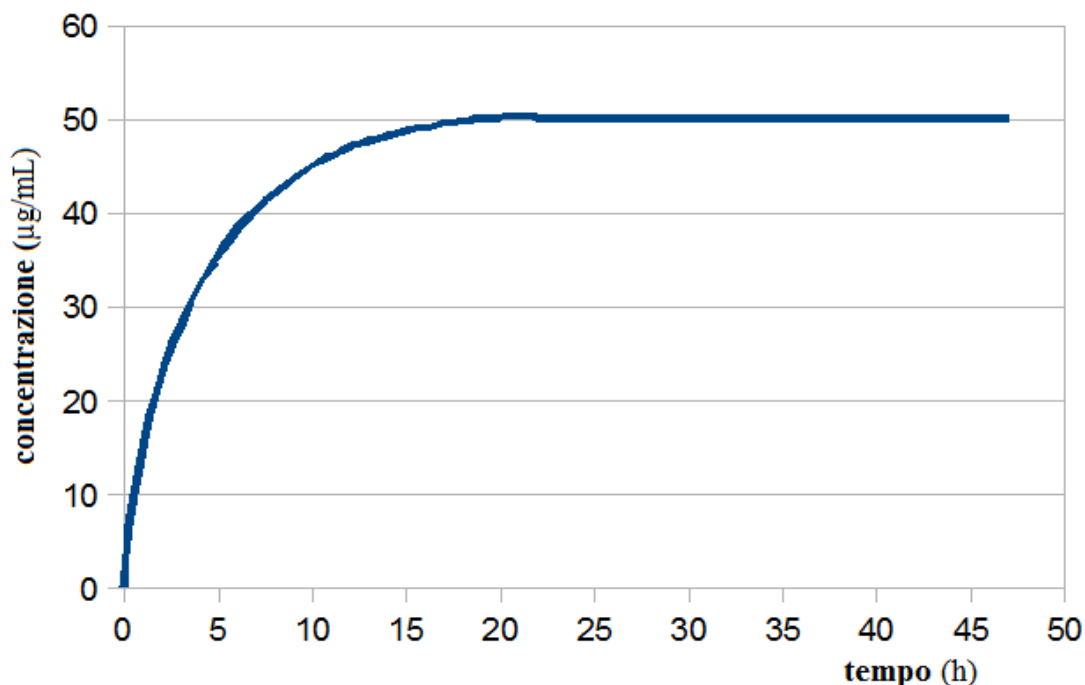


Figura 13: *Diagramma andamento produzione glucosio riguardante terza esperienza.*

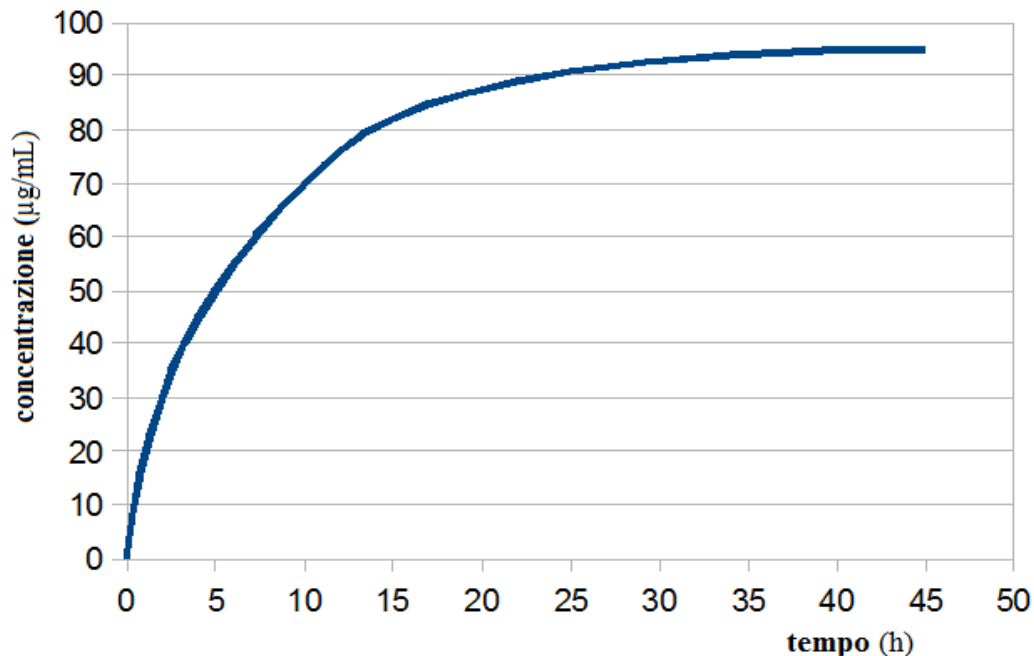


Figura 14: *Diagramma andamento produzione glucosio riguardante quarta esperienza.*

Dal grafico della terza e quarta esperienza si evince che il lievito ha consumato quasi tutto il glucosio. Infatti queste due esperienze prevedono l'utilizzo in contemporanea dell'enzima e del lievito. Rispettivamente si ottiene un massimo di concentrazione di glucosio di 50 µg/mL e 95 µg/mL che equivalgono a 0,006g e 0,011g. L'azione dell'enzima può considerarsi conclusa già dopo 24 ore avendo ottenuto una resa relativa del 95%. Considerando le rese delle esperienze precedenti (1 e 2) si può considerare che l'enzima abbia prodotto glucosio, che poi è stato subito trasformato in etanolo dal lievito. Si può quindi considerare che il lievito e l'enzima hanno almeno la stessa velocità di reazione oppure che il lievito sia ancora più veloce essendo quest'ultimo stato inserito in quantità leggermente inferiori al primo, anche se poi è accresciuto nel tempo.

3.2 RESA ETANOLO

Per quanto riguarda la resa di etanolo si può già preventivamente affermare che il lievito usato ha lavorato perfettamente in ognuna delle quattro esperienze. Per ogni esperienza ci si aspetta una resa del 51% calcolando la percentuale in peso, della formula già descritta nei capitoli precedenti, del prodotto, l'etanolo, nei confronti del reagente, il glucosio.



La resa teorica è di 0.92g di etanolo rispetto ai 5g della biomassa iniziale.

- **Esperienza 1**

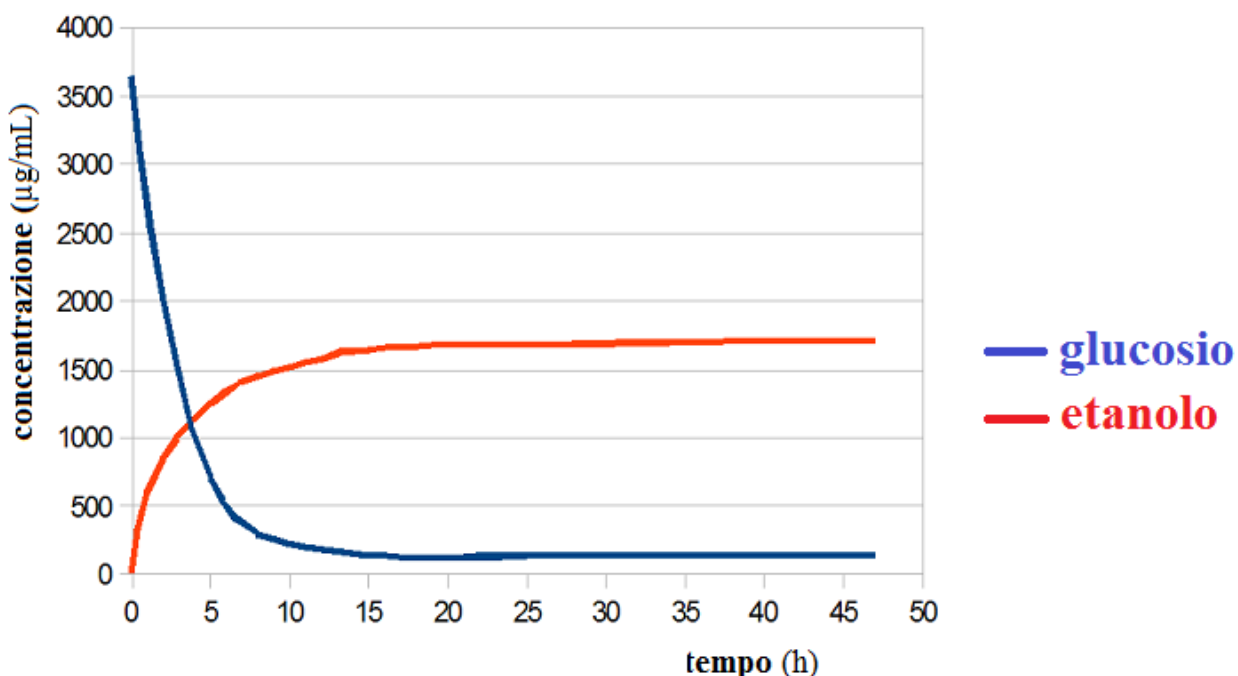


Figura 15: *Diagramma andamento produzione etanolo riguardante prima esperienza.*

Dal grafico della prima esperienza si evince che il lievito, il *Saccharomyces cerevisiae*, ha trasformato il glucosio disponibile con una resa molto alta. L'etanolo è stato determinato tramite l'uso del kit apposito. La concentrazione massima è di $1712 \mu\text{g/mL}$ che equivalgono a $0,24\text{g}$ ottenuti sui 5g di biomassa iniziale. Pertanto rispetto alla resa teorica si ha una conversione finale del 25% di etanolo. Però rispetto al glucosio che era in soluzione, si può affermare che il 94% di questo è stato trasformato in etanolo dal lievito. Pertanto il lievito ha lavorato egregiamente. L'azione del lievito può considerarsi conclusa già dopo 24 ore avendo ottenuto una resa relativa del 95%. Per quanto riguarda gli elementi dannosi per il lievito prodotti nel pretrattamento termo-meccanico, si può affermare che essi non hanno influito sulla resa essendo in concentrazione molto piccole rispetto al lievito.

- **Esperienza 2**

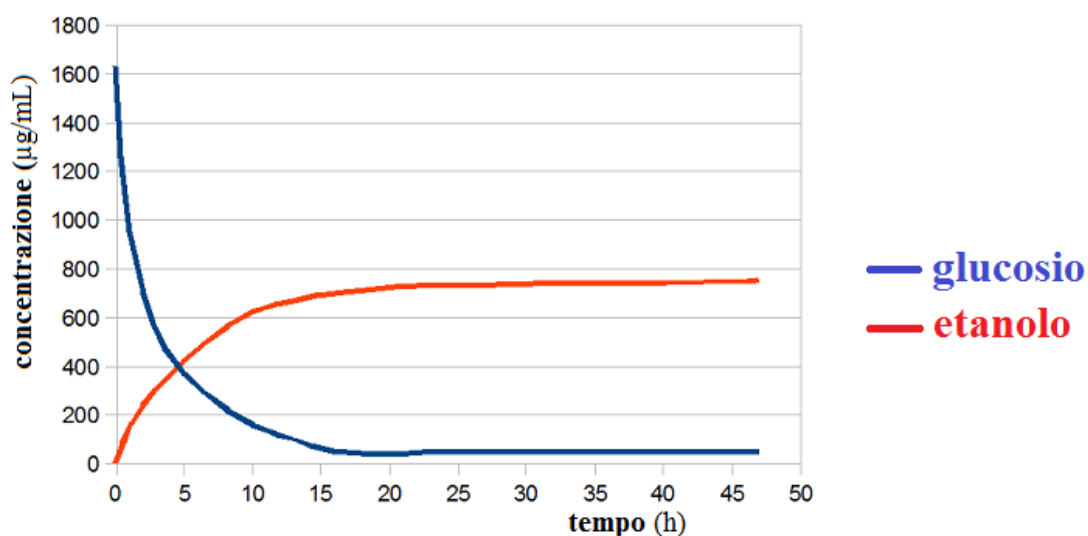


Figura 16: *Diagramma andamento produzione etanolo riguardante seconda esperienza.*

Dal grafico della seconda esperienza, si può affermare che anche in questa esperienza il lievito abbia trasformato il glucosio in soluzione con una resa molto alta. Complessivamente il lievito ha trasformato il 90% del glucosio. La concentrazione massima è di 755 $\mu\text{g/mL}$ che equivalgono a 0,09g di etanolo prodotti su 5g di biomassa iniziale. Bisogna puntualizzare che la filtrazione del campione dopo il pretrattamento termo-meccanico, teorizzata per eliminare gli agenti tossici per il lievito, ha eliminato anche la cellulosa, e quindi del potenziale glucosio, che era finito in soluzione. Pertanto sui 5g di biomassa iniziale si avrebbe una resa di etanolo del 9,8%, però considerando i 2,1g di biomassa dopo il pretrattamento riottenremmo la percentuale di resa del 25%, pari a quella dell'esperienza 1. Anche in questo caso l'azione del lievito può considerarsi conclusa già dopo 24 ore avendo ottenuto una resa relativa del 95% .

- **Esperienza 3**

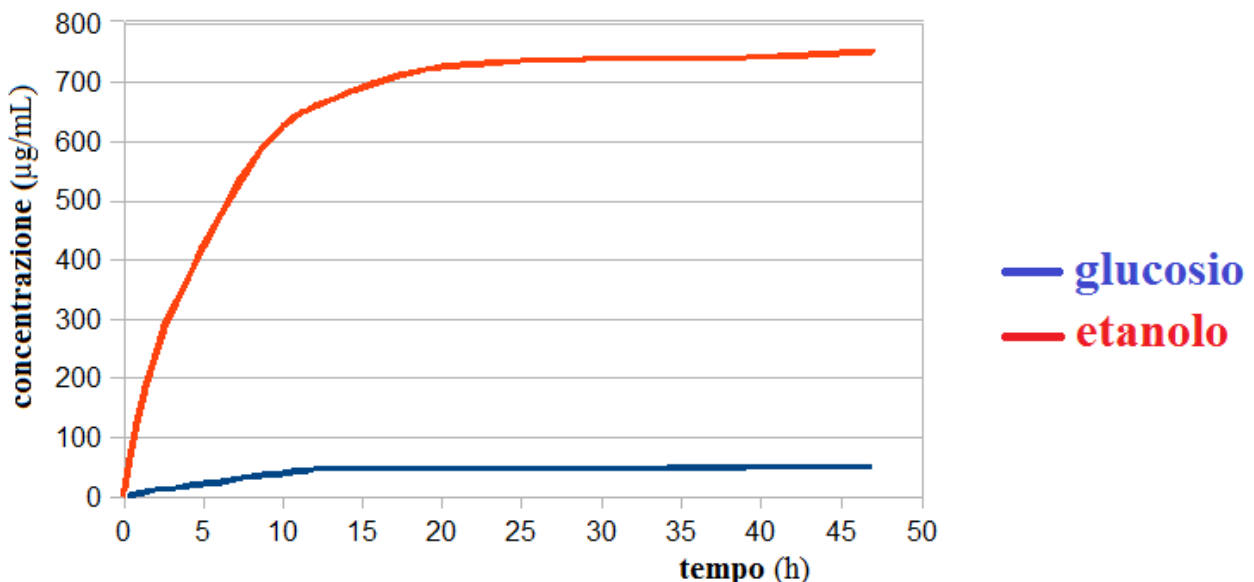


Figura 17: *Diagramma andamento produzione etanolo riguardante terza esperienza.*

Dal grafico relativo alla terza esperienza si può condurre tutte le osservazioni portate avanti nell' esperienza precedente, ovvero l'esperienza 2 sull' etanolo, con una concentrazione massima di etanolo di 755 $\mu\text{g/mL}$ e una resa del 9,8% rispetto ai 5g di biomassa iniziale. L'unica differenza è che se l' esperienza 2 era una SHF, con un decorso di saccarificazione e fermentazione di 96 ore quindi, l'esperienza 3 è una SSF, con un decorso di saccarificazione e fermentazione di 48 ore poiché condotte in contemporanea. Pertanto poiché la resa risulta essere la stessa possiamo affermare due importanti risultati. Il primo è per le concentrazioni ottenute di etanolo e glucosio, non si ha un effetto inibitore del prodotto rispettivamente sul lievito e sull' enzima. Il secondo è che la procedura SSF ottiene la stessa resa di quella SHF, ma con tempi dimezzati. Complessivamente il lievito ha trasformato il 90% di glucosio.

- **Esperienza 4**

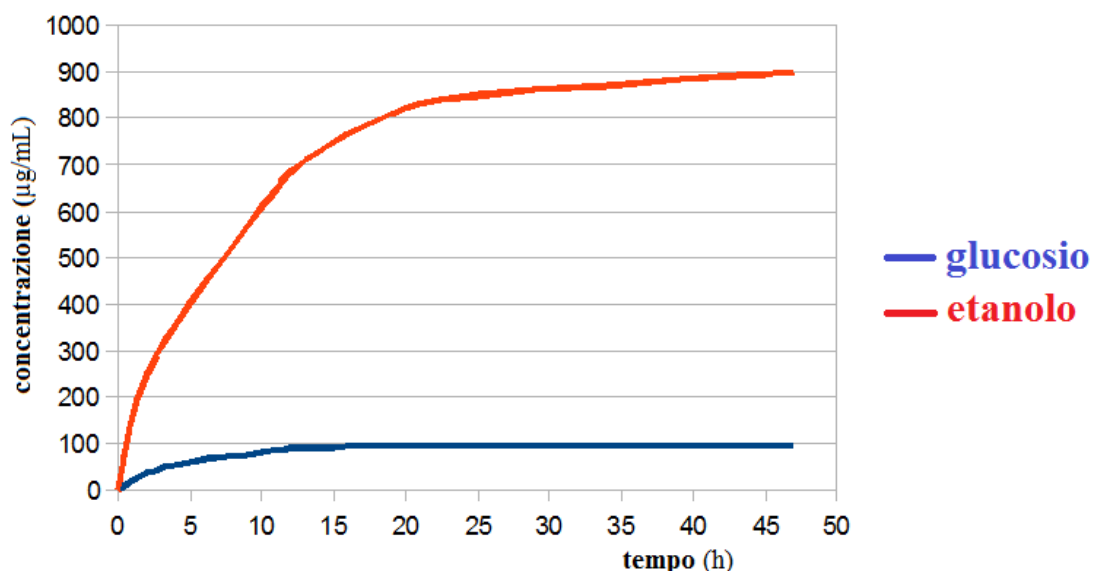


Figura 18: *Diagramma andamento produzione etanolo riguardante quarta esperienza.*

Dal grafico relativo alla quarta esperienza si può affermare che il lievito abbia trasformato il glucosio con una resa elevata. La concentrazione massima di etanolo è di 903 $\mu\text{g/mL}$ che equivalgono ad una produzione complessiva di 0,11g. Questa volta per il calcolo della resa teorica bisogna partire da 2,1g di biomassa. Tenendo conto di questo dettaglio la resa di etanolo ottenuto è del 28,9% rispetto a quella teorica. Pertanto si può già affermare che la resa migliore è proprio quella della quarta esperienza, dove è stato saltato il passaggio in autoclave. Anche in questo caso l'azione del lievito e dell'enzima possono considerarsi conclusi già dopo 24 ore avendo ottenuto una resa relativa del 95% . Si conferma il fatto che utilizzando un processo SSF si dimezzano i tempi rispetto ad un SHF senza che ci siano riscontri negativi sulla resa.

Ricapitolando:

	SHF		SSF	
	Esperienza 1	Esperienza 2	Esperienza 3	Esperienza 4
Peso biomassa secca prima pretrattamento (grammi)	5	5	5	2,1
Peso biomassa secca dopo pretrattamento (grammi)	2,1	2,1	2,1	2,1
Peso biomassa in soluzione dopo pretrattamento (grammi)	2,9	0	0	0

Glucosio teorico (grammi)	1,8	1,8	1,8	0,75
Glucosio ottenuto (grammi)	0,48	0,19	0,19	n. d.
Resa glucosio (rispetto resa teorica)	26,7%	10,6%	10,6%	n. d.
Etanolo teorico (grammi)	0,92	0,92	0,92	0,38
Etanolo teorico (grammi) (rispetto glucosio prodotto)	0,24	0,1	0,1	n. d.
Etanolo ottenuto (grammi)	0,23	0,09	0,09	0,11
Resa etanolo (rispetto resa teorica)	25,0%	9,8%	9,8%	28,9%
Resa etanolo (rispetto glucosio prodotto)	94,0%	90,0%	90,0%	n. d.

Figura 19: tabella delle rese totali di glucosio ed etanolo delle esperienze svolte. In grigio chiaro i dati teorici ottenuti indirettamente tramite confronto con esperienza 2 che presenta corrispondenze dirette con l'esperienza 3. In grigio scuro i dati che non sono disponibili (n.d.) dell'esperienza 4, non ottenibili per confronto diretto o indiretto con le altre esperienze poiché i parametri iniziali sono differenti.

3.3 ANALISI PROCEDIMENTI

- **Pretrattamento autoclave**

Tramite il pretrattamento si è prefissato l'obiettivo di disgregare la cellulosa in maniera che l'enzima potesse attaccare meglio quest'ultima e aumentare pertanto la resa finale. Dai dati ottenuti in effetti si osserva che parte della cellulosa finisce in soluzione come voluto. Infatti nelle esperienze 2 e 3 si osserva un calo del 16,1% sulla resa di glucosio rispetto all'esperienza 1 poichè con la filtrazione si perde la cellulosa finita in soluzione. Inoltre si osserva che la resa di etanolo della biomassa non trattata in autoclave è superiore di 3,9% rispetto a quella trattata dell'esperienza 1. Pertanto, essendo la biomassa divenuta di colorazione più scura, si può avallare l'ipotesi che un'eccessiva pirolisi della cellulosa dovuta alle temperature alte abbia abbassato la resa finale anche se tale pretrattamento ha concesso all'enzima di entrare a contatto con maggior cellulosa. Pertanto, in queste condizioni, il trattamento in autoclave risulta essere inutile e inefficace poichè l'aspetto nocivo della pirolisi copre l'aspetto per il quale era stata ideata la trattazione. Tali risultati e conclusioni sembrano essere in accordo con la ricerca (Schultz-Jensen N. et al., 2013).

- **Enzima**

Per quanto riguarda il lavoro svolto dall'enzima bisogna fare una puntualizzazione. L'enzima usato infatti è una cellulasi. Fra le cellulasi si distinguono tre classi principali: le endo- β -1,4-glucanasi, che agiscono rompendo i legami glicosidici all'interno della catena polisaccarida, frammentandola in catene più piccole ed

esponendo queste all'azione dell'enzima CBH; le cellobioidrolasi (CBH), che aggrediscono queste catene più piccole fino ad arrivare al cellobiosio; infine la β -glucosidasi, che scinde il cellobiosio in due molecole di glucosio. Dopo tale premessa si può affermare che l'enzima utilizzato, l'*Aspergillus niger*, è un endo- β -4-glucanasi da quanto riportato dalla ditta produttrice SIGMA e che riesce a scindere la cellulosa in catene composte da tre a sei molecole di glucosio.

Nonostante tutto però anche un endocellulasi riesce a produrre piccole quantità di glucosio come riportato dalla ricerca (Drissen, 2007). Pertanto si può affermare che la resa finale di glucosio è da considerarsi buona tenendo conto dell'enzima pilota usato. Inoltre non sono stati riscontrati elementi tossici per l'enzima.

Contrariamente si avrebbe avuto una prova indiretta tramite una produzione nulla di glucosio. Pertanto, visto che l'alga è stata prelevata dalla laguna di Orbetello ed ha subito soltanto un processo di lavaggio sotto acqua corrente, si può affermare che il solo processo garantisca per la sopravvivenza dell'enzima, qualora nelle acque siano presenti elementi tossici per quest'ultimo. Anche la presenza batterica è da considerarsi nulla.

Tralasciando il carattere generale ed andando a valutare i dati ottenuti delle esperienze, si può affermare che per la biomassa trattata in autoclave, il 16,1% della cellulosa (trasformata in glucosio) finisce in soluzione. Inoltre tramite l'esperienza 2 si può vedere che un altro 10,6% della cellulosa (trasformata in glucosio) che non si era frammentata tramite il processo in autoclave, viene attaccata e degradata in glucosio dall'enzima pilota. Rispetto alle differenze attese fra processo SHF e SSF, rispettivamente esperienza 2 e 3, si può affermare che a queste concentrazioni non vi è un effetto inibitorio del prodotto sull'enzima e pertanto i due processi mantengono le stesse rese di glucosio. Rispetto all'esperienza 4 si può affermare che l'enzima ha lavorato meglio con una resa in glucosio che si dovrebbe aggirare sul 30% rispetto al 26,7% dell'esperienza 1, anche se non abbiano dati diretti sul glucosio prodotto essendo stato contemporaneamente consumato dal lievito.

• **Lievito**

Per quanto riguarda il lavoro del lievito si può affermare che esso si è comportato in maniera soddisfacente, con rese molto elevate. Le rese relative alla quantità di glucosio che era a disposizione sono infatti rispettivamente del 94% per l'esperienza 1, 90% per l'esperienza 2, 90% per l'esperienza 3. Per l'esperienza 4 non avendo dati sulla resa di glucosio ma solo la concentrazione di etanolo finale, possiamo avallare l'ipotesi sempre di una resa che si aggira attorno all' 93%, in linea con le altre esperienze. Anche in questo caso non si sono manifestati affetti tossici sul lievito, pertanto un lavaggio sotto acqua corrente della biomassa è sufficiente. Anche la presenza batterica è da considerarsi nulla. Inoltre, come per l'enzima, non si è verificata nessuna differenza fra l'esperienza 2 e 3. Pertanto l'effetto inibente del prodotto sul lievito è nullo a tali concentrazioni. La resa del lievito potrebbe essere aumentata leggermente se si fosse applicata un'agitazione continua della soluzione.

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI

Lo studio preliminare sulla potenzialità dell'alga nella produzione di bioetanolo si è dimostrato incoraggiante. Il nodo centrale della ricerca si è focalizzato nel vedere se l'alga contenesse in sé elementi tossici o dannosi per l'enzima e per il lievito, ottenendo un esito negativo. La produzione di glucosio, nonostante l'uso di un'enzima pilota poco adatto alla trasformazione della cellulosa in glucosio, fa ben sperare e conferma che la *C. linum* è un'ottima biomassa per la produzione di etanolo. La presenza di metalli pesanti nella laguna di Orbetello suggerisce un controllo sull'alga tramite assorbimento atomico nel caso fossero presenti in essa in quantità non irrisorie, ma che non risultano essere notevolmente tossiche sia per l'enzima che per il lievito. Si può pertanto dichiarare chiusa la fase preliminare della ricerca ed iniziare una fase successiva concentrandosi sul miglioramento della resa finale. A tale scopo il procedimento SSF è risultato essere migliore di quello SHF e la macinazione, magari sperimentando tecniche quali balling milling, risulta essere più efficace del trattamento termo-meccanico (Schultz-Jensen N. Et al., 2013). Inoltre è consigliabile usare lieviti e enzimi di nuova generazione, modificati dall'uomo proprio per l'uso di questi processi.

In conclusione l'alga *C. linum* risulta essere di particolare importanza essendo una risorsa strategica nazionale nella produzione di biocombustibili. Inoltre, essendo una specie che si sviluppa abbondantemente in condizioni eutrofiche, si stima che in Italia ci siano grandi quantità di tale alga ancora non quantificate. Dai documenti studiati possiamo dire che si è ben sviluppata nelle lagune di Orbetello (Specchiulli et al., 2008), Varano (Specchiulli et al., 2008) e Venezia (Fiorin., 2008), lago di Ganzirri in Sicilia e nel Mar Piccolo di Taranto (Cecere et al., 2009) (Stabili et al., 2007). Pertanto si suggerisce anche uno scansionamento nazionale per determinare le località dove sia maggiormente presente.

Ricapitolando sono stati individuati punti chiave per il miglioramento del processo di conversione che possono essere sintetizzati in:

- Necessità di trovare tecniche di pretrattamento più efficienti e meno costose.
- Eliminazione filtraggio dopo pretrattamento poichè riduce la resa.
- Pretrattamento autoclave risulta essere ininfluenza, se non dannoso, rispetto alla semplice macinazione (a causa di una lieve pirolisi della biomassa).
- processo SSF migliore di SHF poichè dimezza i tempi e garantisce stessa resa.
- Necessità di utilizzare enzimi più specifici di nuova generazione per ottenere rese elevate.

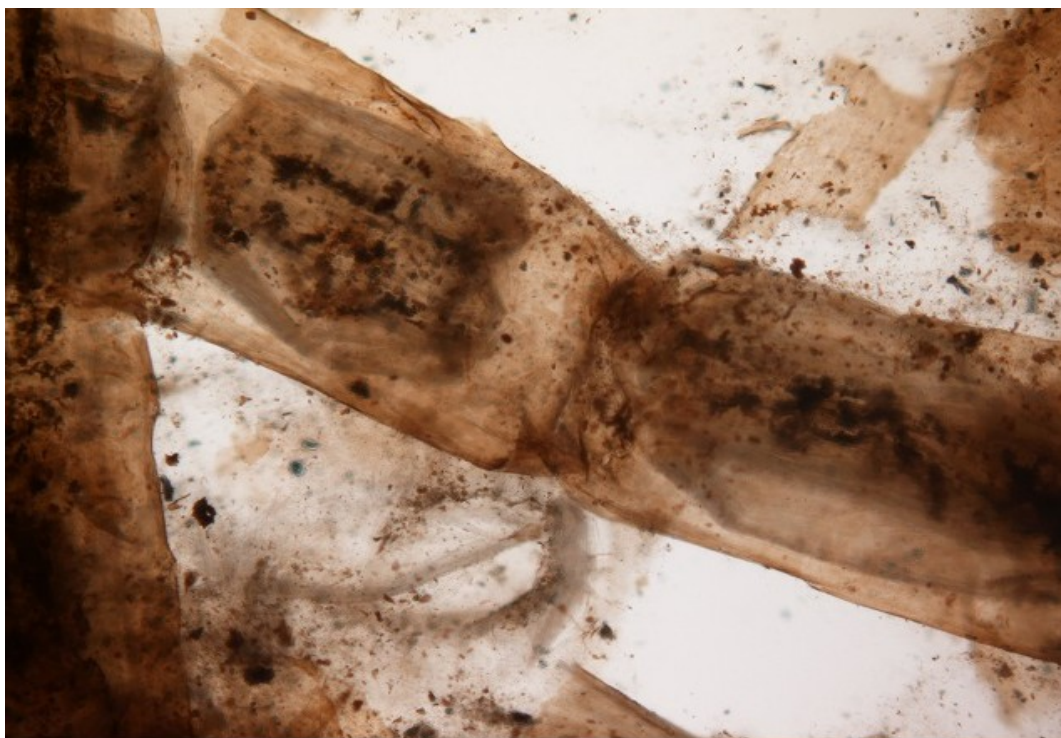


Figura 20: immagine C. *Linum* dopo trattamento autoclave e procedura SSF. Microscopio ottico ingrandimento x10.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Lenzi M. , Palmieri R. , Porrello S. , Restoration of the eutrophic Orbetello lagoon (Tyrrhenian Sea, Italy): water quality management, *Marine Pollution Bulletin*, **46**, 1540-1548, (2003).
- 2) Bastianoni S. , Coppola F. , Tiezzi E. , Colacevich A. , Borghini F. , Focardi S. , Biofuel potential production from the orbetello lagoon macroalgae: A comparison with sunflower feedstock, biomass and bioenergy, **32**, 619-628, (2008).
- 3) Specchiulli A. , Focardi S. , Renzi M. , Scirocco T. , Cilenti L. , Breber P. , Bastianoni S. , Environmental heterogeneity patterns and assessment of trophic levels in two Mediterranean lagoons: Orbetello and Varano, Italy, *Science of the total environment*, **402**, 285-298, (2008).
- 4) Giusti E. , Marsili-Libelli S. , Renzi M. , Focardi S. , Assessment of spatial distribution of submerged vegetation in the Orbetello lagoon by means of a mathematical model, *Ecological Modelling*, **221**, 1484-1493, (2010).
- 5) Gennaro P. , Guidotti M. , Funari E. , Porrello S. , Lenzi M. , Reduction of land based fish-farming impact by phytotreatment pond system in a marginal lagoon area, *Aquaculture*, **256**, 246-254, (2006).
- 6) Marsili-Libelli S. , Fuzzy prediction of the alga blooms in the Orbetello lagoon, *Environmental Modelling & Software*, **19**, 799-808, (2014).
- 7) McGlathery J. K. , Pedersen F. M. , The effect of growth irradiance on the coupling of carbon and nitrogen metabolism in *Chaetomorpha linum* (Chlorophyta), *J. Phycol.* , **35**, 721-731, (1999).
- 8) Schultz-Jensen N. , Thyngensen A. , Leipold F. , Thomsen T. S. , Roslander C. , Liholt H. , Bjerre B. A. , Pretreatment of the macroalge *Chaetomorpha linum* for the production of bioethanol – Comparison of five pretreatment technologies, *Biosource Tecnology*, **140**, 36-42, (2013).
- 9) Maugini E. , Maleci Bini L. , Mariotti Lippi M. , *Botanica farmaceutica*, Piccin, IX edizione, 2014.

bibliografia

- 10) Raven H. P. , Evert F. R. , *Biologia delle piante*, Zanichelli, sesta edizione, 2002.
- 11) Mauseth D. J. , *Botanica biodiversità*, Idelson Gnocchi, seconda edizione italiana, 2003.
- 12) Reinert J. , *Chloroplasts*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1980.
- 13) Cozzi R., Protti P. , Ruaro T. , *Analisi chimica strumentale*, Zanichelli, seconda edizione, 2006.
- 14) Nelson L. D. , Cox M. M., *i principi di biochimica di Lehninger*, Zanichelli, terza edizione, 2002.
- 15) Drissen R. E. T. , Maas R. H. W. , Van Der Maarel M. J. E. C. , Kabel M. A. , Schols H. A. , Trampe J. , Beeftink H. H. , A generic model for glucose production from various cellulose sources by a commercial cellulase complex, *Biocatalysis and Biotransformation*, **25**(6), 419-429, (2007).
- 16) Fiorin R. , Cerasuolo C. , Curiel D. , Riccato F. , Fish and macroalgal community of the venetian litoral rocky shores: interaction between macroalgae of the genus *Cystoseira* and some fish species, *Biol. Mar. Mediterr.* , **15**(1), 304-305, (2008).
- 17) Cecere E. , Portacci G. , Petrocelli A. , Fragmentation and ball-like forms of *Chaetomorpha linum* (Cladophorales, Chlorophyta) in the Mar Piccolo of Taranto, *Biol. Mar. Mediterr.*, **16**(1), 252-253, (2009).
- 18) Stabili L. , Acquaviva M. I. , Cavallo R. A. , Cecere E. , Narracci M. , Petrocelli A. , Antibacterial activity in macroalgae of Mar Piccolo of Taranto, *Biol. Mar. Mediterr.* , **14** (2), 412-413, (2007).
- 19) Clini C., Caltagirone M. , Il ruolo delle bioenergie per la riduzione della CO₂, *Gazzetta Ambiente*, March 2008.
- 20) Von Braun J. , The world food situation, IFPRI, December 2007.
- 21) Esmeralda R. , Zimbardi F. , Viola E. , Braccio G. , Etanolo da biomasse lignocellulosiche, ENEA, ente per le nuove tecnologie l energia e l'ambiente, maggio 2001.
- 22) Adams, J.M., Gallagher, J.A. Iain, S., fermentation study of Saccharina

bibliografia

- latissima for bioethanol production considering variable pre-treatments, *Appl. Phycol*, **21**, 569-574, (2009).
- 23) Bjerre A. B., Olsen A.B., Fernqvist, T., Ploger A., Schmidt A.S., pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose, *Biotechnol and Bioeng.*, **49**, 568-577, (1996).
- 24) Thomsen M.H., Thygesen A., Thomsen A.B., identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **83**, 447-455, (2009).
- 25) Wang X., Liu X., Wang G., two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation, *Integr. Plant Biol.*, **53**, 246-252, (2011).
- 26) Richardson K., Berdall J., Raven J.A., Adaptation of unicellular algae to irradiance:an analysis of strategies, *Ecol. Monogr*, **62**, 365-392, (1983).
- 27) Demerdash M., Attia R. M., thermal reactivity as a function of the extent of reaction in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose, *Biotechnol Bioeng*, **56(6)**, 650-655, (1997).
- 28) Gonzalez G, Caminal G., Demas C., Lopezasantin J., A kinetic-model for pretreated wheat straw saccharification by cellulase, *Chem Technol Biotechnol*, **44(4)**, 275-288, (1989).
- 29) Philippidis G.P., Spindler D. D., Wyman C. E., Mathematical modeling of cellulase conversion to ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process, *Appl Biochem Biotechnol*, 34-5, (1992).

Ringraziamenti

Ringrazio il professor Bardi, il professor Papini e il professor Innocenti per la pazienza, la disponibilità e i preziosi insegnamenti. Un ringraziamento speciale anche a Pietro, Corrado, Stefano e Alessio.

