

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA**

**FACOLTA DI SCIENZE MATEMATICHE
FISICHE E NATURALI**

Corso di laurea specialistica in
SCIENZE PER L'AMBIENTE E IL TERRITORIO

Biocombustibili da Microalghe
Studio analitico dei processi di estrazione e
pirolisi.

Tesi di Laurea in C.I. Chimica del Mare

Relatore: Prof. Fabbri Daniele

Laureando: Federico Lonzar

Correlatori: Prof. Pistocchi Rossella

Dott. Torri Cristian

III Sessione

Anno accademico 2009-2010

<i>Prefazione</i>	1
Indice	3
Capitolo 1 – I biocombustibili.	5
1.1 – I diversi biocombustibili a confronto:	
caratteristiche e tecnologie.	10
1.2 – L’evoluzione dei biocombustibili.	18
1.3 – I biocombustibili da microalga.	21
1.4 – Le metodologie di conversione.	23
Estrazione e transesterificazione dei lipidi.	23
Pirolisi.	25
Capitolo 2 – Scopo della tesi.	28
Capitolo 3 – Caratteristiche delle alghe.	29
3.1 – <i>Dunaliella salina</i> .	30
3.2 – <i>Scenedesmus sp.</i>	32
3.3 – <i>Nannochloropsis gaditana</i> .	34

Capitolo 4 – Materiali & Metodi.	36
4.1 – Coltivazione.	36
4.2 – Raccolta.	44
4.3 – Estrazioni e analisi dei lipidi.	46
Estrazioni a freddo.	46
Estrazioni a caldo.	47
Determinazione dei lipidi totali.	49
Transesterificazione degli acidi grassi.	49
Analisi GC/MS e GC/FID.	50
4.4 – Pirolisi analitica Py-GC/MS.	51
4.5 – Metodi di determinazione.	51
Determinazione delle proteine.	54
Determinazione dei polisaccaridi.	55
Determinazione delle ceneri.	56
Determinazione dell'umidità del liofilizzato.	56
Determinazione dell'Analisi Elementare.	56
Capitolo 5 – Risultati.	57
5.1 – Curve di crescita.	57
5.2 – Pirolisi analitica Py-GC/MS.	60

Py-GC/MS dei filtri raccolti durante la crescita.	60
Py-GC/MS della biomassa algale.	67
5.3 – Estrazione con solvente dei lipidi.	70
Estrazioni a freddo.	70
Estrazioni a caldo.	71
5.4 – Pirolisi da banco.	74
5.5 – Analisi degli esteri metilici degli acidi grassi (FAME).	77
5.6 – Composizione chimica.	81
Capitolo 6 – Conclusioni.	83
<i>Ringraziamenti.</i>	86
Riferimenti Bibliografici.	88

Prefazione

“Pochi anni fa il mondo si trovava al culmine della bolla di ottimismo della «new economy» con le borse occidentali in crescita di un ritmo medio del 18% all’anno da 10 anni.

La storia, secondo Francis Fukuyama, era finita con il crollo dell’Unione Sovietica. Ora non ci restava che godere i frutti della superiorità tecnologica occidentale. Nessuno si preoccupava del fatto che questa ricchezza era basata su risorse non rinnovabili, e chi se ne occupava lo faceva per dire che queste erano abbondanti e costavano sempre meno. Nel marzo 1999, il prezzo del petrolio era sceso a un minimo record di soli 10 dollari al barile e la prestigiosa rivista “The Economist” pubblicava un editoriale intitolato «Il petrolio a 5 dollari al barile potrebbe essere dietro l’angolo».

Esattamente a un anno di distanza, nel marzo del 2000, il petrolio era saltato a 34 dollari al barile, il doppio del valore medio degli ultimi 15 anni, un valore che si è mantenuto a quei livelli da allora. Iniziava nel 2000 lo scoppio della «bolla» della nuova economia e l’inizio della caduta delle borse che dura ormai da più di tre anni e di cui non si vede la fine.” (Ugo Bardi, 2003)

Lo scrittore scientifico, Ugo Bardi, introduce così il problema energetico del ventunesimo secolo, delineando la fine dei combustibili fossili e la necessità di trovare nuove alternative, per un futuro senza combustibili tradizionali ormai imminente. (Ugo Bardi, “La fine del petrolio. Combustibili fossili e prospettive energetiche nel ventunesimo secolo”).

Il problema della disponibilità energetica, ha da anni dato l’avvio ad una crescente ricerca, di nuove idee e tecnologie, per fronteggiare la necessaria sostituzione dei combustibili fossili in un’epoca così fortemente “affamata di energia”, come il ventunesimo secolo.

L'attuale totale dipendenza, è presente anche nel settore dei trasporti. Inoltre tutti i prodotti, ottenuti dai derivati del petrolio, ricoprono un ruolo fondamentale nella vita di tutti, dai privati alle industrie.

Per rispondere ad una sempre crescente domanda di alternative sono stati varati numerosi studi e ricerche tese all'identificazione di nuove fonti e tecnologie per rimpiazzare i combustibili fossili attualmente in uso.

Molti studi hanno identificato, nella possibilità di produrre combustibili dalle biomasse, il futuro da intraprendere, determinando così la nascita concettuale dei biocombustibili.

Introduzione

Il problema della sostituzione della fonte energetica rappresentata dai combustibili fossili, con fonti rinnovabili e a più basso impatto ambientale, ha spinto l'Europa e non solo, nella direzione dei biocombustibili.

La produzione di biocombustibili nel mondo, secondo le stime riportate dall'IEA nel rapporto "Biofuels for transport" del 2004, nel solo 2005 è aumentata ben oltre le 32 milioni di tonnellate. Questa produzione, a livello mondiale, è costituita per oltre il 90% da bioetanolo, mentre a livello europeo, il biodiesel nello specifico, ricoprire l'81,5% dei biocarburanti prodotti.

L'impulso produttivo e di sviluppo che si è manifestato negli ultimi decenni è stato promosso sia dalla ricerca che dagli investimenti, ma è stato anche possibile grazie alle numerose leggi e disposizioni promosse dagli stati e dall'Europa. Un esempio ne è la legge emanata dal Consiglio dell'Unione Europea, l'8 ed il 9 marzo 2007 a Bruxelles, che ha posto gli obiettivi comunitari per una politica più sensibile alle problematiche ambientali, fornendo degli obiettivi specifici e dei vincoli, tra cui una quota di produzione per i biocombustibili.

La promulgazione della nuova Politica Energetica per l'Europa, la PEE, ha posto in essere i seguenti obiettivi, al fine di imporne il raggiungimento entro la data del 2020:

- il 20% dell'energia consumata dall'Unione Europea dovrà provenire da fonti energetiche rinnovabili;
- la riduzione del 20% della produzione dei gas serra;
- la riduzione del 20% dei consumi relativi all'energia nell'edilizia, nell'industria e nei trasporti;
- il 10% del totale dei consumi di carburanti per l'autotrazione dell'UE dovrà provenire da fonti rinnovabili (biocarburanti).

Questi obiettivi sono un esempio di come stia venendo strutturata la nuova politica ambientale europea e di come un simile problema ambientale necessiti di limiti temporali precisi e definiti.

Capitolo 1 - I biocombustibili

La necessità di combustibili del ventesimo secolo, prima, e del ventunesimo, poi, si è scontrata con la difficile realtà dell'impossibilità, di sopperire ancora a lungo alla richiesta energetica con i soli giacimenti di combustibili fossili.

Questa difficile realtà, oltre alla consapevolezza che i combustibili fossili determinano uno sbilanciamento in negativo sul carico di anidride carbonica nel ciclo naturale del carbonio, hanno dato l'avvio ad una campagna di ricerca e sviluppo di tecnologie alternative, mettendo inoltre in risalto che l'utilizzo dei combustibili fossili è, da un punto di vista ambientale, insostenibile (Chisti Y. et al., 2007).

Questi motivi hanno dato il via a una delle più grandi sfide del nuovo millennio, la ricerca di nuove alternative energetiche da sfruttare, sia per la produzione di energia che per il trasporto. Nel ricercare queste alternative sono state identificate delle qualità essenziali come la rinnovabilità e la neutralità rispetto al ciclo del carbonio (Gavrilescu M. et al., 2005). Queste due qualità sono fondamentali per discriminare le nuove fonti come sostenibili.

Una possibilità che ha visto un notevole sviluppo è quella che prevede l'utilizzo delle biomasse, sia in maniera diretta che in maniera indiretta (produzione di biocombustibili). Questa fonte è sembrata, sin dall'inizio, un'alternativa potenzialmente valida, poiché la possibilità di ottenere energia dalle biomasse. In linea di principio soddisferebbe entrambe i criteri di rinnovabilità e di neutralità rispetto al ciclo del carbonio, che sono ricercati (Gavrilescu M. et al., 2005).

La combustione diretta per mezzo di termovalorizzatori, tuttavia, non ha evidenziato una così alta resa (costi/benefici), mentre la possibilità di sviluppare biocombustibili dalle biomasse ha destato un interesse ben più grande facendo intravedere prospettive di sviluppo ben maggiori.

Inizialmente, l'utilizzo di biomasse di natura oleaginosa, come ad esempio le piante di mais, la colza, la palma, la soia, etc. ha permesso di sviluppare i primi biocombustibili, che sono stati utilizzati poiché prodotti ricchi di idrocarburi.

Proprio la scelta di queste colture è stata fatta sulla base delle caratteristiche intrinseche della biomassa, che essendo ricca in acidi grassi liberi può essere

facilmente trasformata, sia attraverso processi chimici che attraverso processi termici, in biocombustibili.

Un'altra via percorsa è stata quella di testare, anche gli olii vegetali esausti, usati a scopo alimentare, o i grassi di origine animale, ma i risultati non hanno destato un grande interesse.

Lo studio dei prodotti ottenibili dalle colture agricole ha messo in luce la possibilità di ottenere biocombustibili dalle materie ligneo-cellulosiche, costituenti il residuo agricolo e forestale, che attraverso trattamenti termici e di degradazione bio-chimica (fermentazione), danno biocombustibili, come ad esempio è il bioetanolo da cellulosa (Posten C. et al., 2009).

I prodotti derivanti dalla fermentazione, come il bioetanolo o i biogas, costituiscono una nuova fonte in grado di eliminare due problemi. Il primo problema è lo smaltimento dei residui agro-forestali di scarto e il secondo, legato strettamente alla coltivazione delle colture oleaginose e amidacee, consiste nell'eliminazione della competizione tra le colture alimentari e quelle destinate alla produzione dei biocombustibili, per quanto riguarda l'utilizzo dei terreni agricoli.

Questo secondo problema si è da subito palesato come un dilemma di carattere etico-morale, poiché pone la questione dell'opportunità o meno di utilizzare i terreni agricoli per un uso diverso da quello alimentare.

Questo nuovo utilizzo, infatti concorrendo con l'uso classico alimentare, porta a una concorrenza economicamente iniqua tra "l'alimentare" e il "non-alimentare", offrendo maggiori profitti e minori sforzi a chi sceglie di produrre biomassa per biocombustibili anziché coltivazioni alimentari (Sims R. et al., 2008). Conseguenza di questa nuova tendenza è il calo della produzione agricola e con essa il rialzo dei prezzi di mercato dei prodotti agricoli e consecutivamente dei prodotti alimentari con essi prodotti.

Entrambe le tecnologie citate sono, ad oggi, oggetto di studi approfonditi e in fase di sperimentazione e produzione in impianti localizzati un po' in tutto il mondo. Sia le colture oleaginose che quelle ligneo-cellulosiche stanno venendo utilizzate per produrre biocombustibili ed anche se la quota prodotta non sono in grado di ricoprire ancora una fetta così considerevole nel panorama energetico mondiale,

questa produzione si affianca alle altre fonti rinnovabili, come il geotermico, l'idroelettrico, il solare e l'eolico.

Per ora l'obiettivo iniziale è di sostituire, almeno parzialmente, attraverso i biodiesel da coltura oleaginosa e l'etanolo da coltura zuccherina i combustibili classici, al fine di ridurre l'utilizzo.

Le percentuali di miscelazione attualmente usate per i carburanti si aggirano attorno al 10-20%, mentre in futuro aumenteranno via via, sino a rimpiazzare completamente i combustibili tradizionali (An J.Y. et al., 2003). Questa transizione graduale ha lo scopo di permettere che i nuovi combustibili vengano sviluppati gradualmente, eliminandone così gli inconvenienti (es. acidità eccessiva e potere solvente alto), e al contempo permettere una diminuzione della domanda e del consumo di combustibili fossili.

Invece per prodotti come il biogas prodotto attraverso la fermentazione di biomasse, ne sono un esempio gli stabilimenti di conversione presenti in Olanda, Germania o Svezia, il biogas viene già utilizzato direttamente, tant'è che viene immesso "puro" nella rete del gas di questi paesi (An J.Y. et al., 2003; Persson M. et al., 2010).

Per ottenere una maggiore sostituzione dei combustibili fossili è necessario mettere a punto nuove generazioni di biocombustibili, che se non soppianderà i combustibili tradizionali, certamente aumenterà la quota biocombustibile prodotta (Williams P.J.L. et al., 2007).

La produzione basata sulle colture di piante superiori, hanno evidenziato in breve tempo un problema comune, ovvero l'incapacità di consentire una produzione significativa tale da risultare rilevante rispetto all'esistente domanda di combustibili legata soprattutto al settore strettamente energetico e a quello dei trasporti (Chisti Y. et al., 2007).

Questo limite ha spinto la ricerca a continuare nell'investigazione di altre alternative, al fine di trovare delle fonti capaci di avere un peso maggiore nell'intero bilancio energetico.

La ricerca di una fonte capace di permettere produzioni sensibilmente maggiori ha portato attualmente la ricerca sulla biomassa di origine algale e sulla modifica

genetica della stessa. Questo ha determinato una massimizzazione dei processi e l'ottenimento di rese quantitative sensibilmente maggiori. Inoltre l'utilizzo di vie termochimiche, la gassificazione, così come di vie biologiche, come la fermentazione e la biofotolisi, ha permesso un'ulteriore sviluppo sia qualitativo dei prodotti ottenuti che quantitativo dei combustibili prodotti. Il tutto sempre mantenendo un bilancio di diossido di carbonio neutro con l'atmosfera (Posten C. et al., 2009).

La produzione di biocombustibili dalle microalghe (Posten C. et al., 2009) potrebbe essere la nuova fonte, ecocompatibile e non competitiva per i terreni agricoli, che può dare attraverso la sua alta produttività la possibilità di produrre biocombustibili in modo da coprire una maggior fetta del fabbisogno energetico.

La biomassa algale ha inoltre un'ampia varietà di specie al suo interno, capaci delle più diverse produzioni. A partire da microalghe particolarmente ricche in lipidi, così come da microalghe ricche in polisaccaridi è possibile produrre biocombustibili, ma anche dalle alghe che producono spontaneamente idrogeno o idrocarburi è possibile ottenere combustibili di natura biologica.

La biomassa algale risulta quindi al momento al centro dell'attenzione poiché estremamente versatile. La non totale conoscenza di tutte le specie è quindi il maggior limite e proprio per ovviare a questo problema stanno venendo via via studiate numerose specie in modo incrociato in tutto il mondo.

L'incredibile fermento e lo sviluppo di questi nuovi combustibili, così come lo studio delle procedure e delle tecniche ad essi collegati, come i nuovi metodi estrattivi (Samorì C. et al., 2010; Chisty Y. et al., 2007-2008; Rosemberg et al., 2008) stanno velocemente evolvendosi, permettendo così una rapida trasformazione del panorama mondiale.

In tutto ciò risalta un aspetto singolare, ovvero che l'utilizzo specifico di combustibili di natura bio- finalizzati al trasporto, non è una novità dei nostri tempi, ma bensì una possibilità nota sin da quando il motore a scoppio fu inventato e costruito.

Infatti lo stesso Dr. Rudolf Diesel, in occasione della presentazione del suo primo motore diesel, alla fiera mondiale di Parigi nel 1911 (Demirbias A. et al., 2002), aveva utilizzato per la dimostrazione un combustibile di natura biologica, fatto

questo citato nell'articolo di presentazione del motore da lui inventato nel 1893 (Diesel R. et al., 1984). In quell'occasione, durante la presentazione al mondo del suo motore a combustione, l'inventore, nel dire che:

“Il motore diesel può essere alimentato con qualsiasi olio vegetale ...”

(Demirbas A. et al., 2002).

La scelta di utilizzare proprio quel combustibile e la frase che l'inventore disse in quell'occasione, ci stupiscono non poco al giorno d'oggi se pensiamo alle difficoltà che troviamo ad immaginare un futuro senza i combustibili fossili.

1.1 – I diversi biocombustibili a confronto: caratteristiche e tecnologie.

Analizzando i prodotti derivanti dalle biomasse risulta chiaro come ognuno di questi sia il derivato di una particolare tipologia di biomassa e di una specifica tecnica (fig. 1.1.1).

Il biodiesel, ad esempio, è ottenuto dalla lavorazione della frazione lipidica estratta dalla biomassa algale, sia con processi fisici (presse) che con processi chimici (solventi).

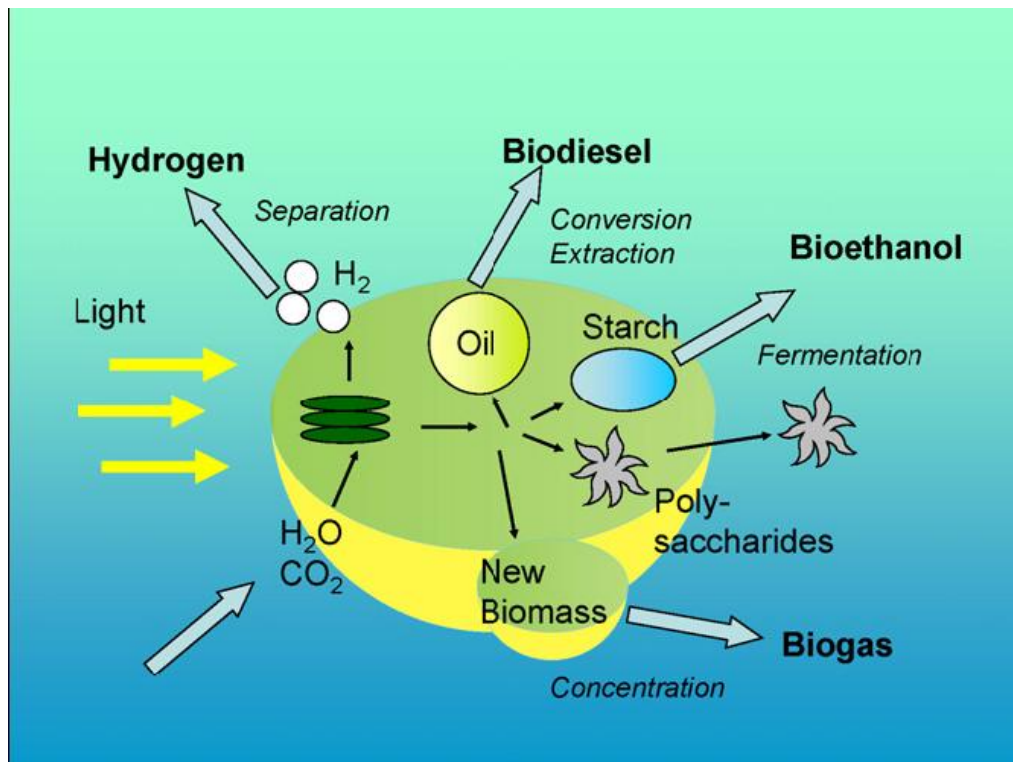


Fig. 1.1.1 Schema riassuntivo dei combustibili potenzialmente derivabili dalla biomassa da Posten C., Schaub G.; "Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels. A process view".

Il bioetanolo, invece, è un combustibile liquido derivante da processi fermentativi dei carboidrati della biomassa.

Per quanto riguarda i prodotti di tipo gassoso la produzione di biogas, dovuta alla digestione anaerobica della biomassa algale (Schamphelaire L. et al., 2009) è un altro processo estremamente importante, così come la produzione di bioidrogeno. Quest'ultimo, in particolare, è prodotto direttamente dalla biomassa, se posta in condizione di stress. L'idrogeno viene prodotto già in forma gassosa direttamente da parte delle microalghe, ancora vive e in fase liquida (Benemann J.R. et al., 2000).

Le quattro categorie precedentemente citate, il biodiesel, il bioetanolo, il biogas e il bioidrogeno sono definiti nei seguenti modi (Gupta R.B. et al., 2010):

Il **biodiesel** è un prodotto ottenuto dagli oli vegetali per mezzo di una reazione, chiamata transesterificazione (Haas M.J. et al., 2006), con metanolo. Gli obiettivi della transesterificazione sono l'abbassamento della viscosità dei derivati oleosi.

Questo processo prevede che il metanolo, reagisca con gli acilgliceroli dell'olio vegetale in presenza di un agente catalizzante basico, come ad esempio l'NaOH, per dare infine un FAME (Esteri metilici degli acidi grassi) separato dal glicerolo. Il glicerolo prodotto mantiene una proporzione, con il biodiesel, pari a 0,1 kg di glicerolo per ogni kg di biodiesel prodotto (Haas M.J. et al., 2006).

La transesterificazione è un metodo a basso costo per trasformare i lipidi saponificabili presenti nell'olio vegetale, caratterizzate da strutture complesse, in piccole molecole caratterizzate da brevi catene lineari, compresa fra C14 e C22, simili a quelle che si ritrovano nel diesel classicamente usato nei motori. Dal 2004 al 2007, la produzione di biodiesel in Europa è raddoppiata ogni anno, giungendo fino ai 10 miliardi di litri/anno del 2007 (Beriens C. et al., 2008). La fetta più consistente del biodiesel attuale è prodotta a partire dalla soia, dalla colza e dall'olio di palma.

L'importanza dell'olio di soia, dal punto di vista alimentare, è la causa dell'ampia variabilità dei prezzi di produzione del biodiesel prodotto con questa tecnica. Tuttavia vi è una notevole abbondanza di altri oli a basso costo, così come di grassi di origine animale (scarti della ristorazione o delle industrie), che possono essere utilizzati a tale scopo e convertiti in biocarburanti.

Il biodiesel solitamente ha un basso potere calorifico ed è capace di produrre una bassa coppia, tuttavia è comunque molto utilizzato. Il biodiesel, inoltre, è migliore

del diesel poiché ha contenuti di zolfo minori, maggior biodegradabilità, miglior contenuto di idrocarburi aromatici e un miglior punto di accensione.

Questo combustibile, comunemente prodotto in Europa, anche se occupa l'81,5% delle terre destinate alle colture destinate alla produzione di biocombustibili, non è ancora sfruttato a pieno (Fonte INEA 2008).

Il **bioetanolo** è un biocarburante liquido caratterizzato da bassa viscosità, attualmente il più utilizzato al mondo (Demirbas A. et al., 2007). Viene prodotto attraverso processi di tipo fermentativo a partire dalla matrice zuccherina della biomassa ed è classicamente ottenuto da piante come la canna da zucchero, la barbabietola da zucchero o il mais. La sua produzione può avvenire, oltre che per fermentazione, attraverso la catalisi da parte di lieviti o di batteri. Un esempio è il comune lievito, un ascomiceta, che è in grado, per via enzimatica, di intervenire sugli zuccheri promuovendone la fermentazione e agevolando la trasformazione in bioetanolo (Demirbas A. et al., 2008).

Le biomasse più sfruttate per la produzione del bioetanolo sono la canna da zucchero e poi la farina di mais. Nello specifico, in America, il bioetanolo viene prodotto a partire dalla canna da zucchero, mentre in Europa viene prodotto utilizzando per lo più la barbabietola, per ragioni legate al clima (Beriens C. et al., 2008).

Un altro metodo produttivo è la saccarificazione della cellulosa, che prevede attraverso trattamenti enzimatici e non solo, la rottura dei polisaccaridi in zuccheri semplici, più semplici da fermentare (Demirbas A. et al., 2008).

L'attuale utilizzo della biomassa cellulosica è ancora molto limitato a causa dell'alto costo dei pretrattamenti necessari per la degradazione della struttura cristallina della cellulosa. Ciononostante il etanolo è estremamente importante non solo come carburante, ma anche in ambito sia alimentare, nelle bevande, che industriale, per la preparazione dei farmaci e per quella dei cosmetici.

Il bioetanolo viene ad oggi utilizzato nei motori, miscelato al 10% con la benzina (Beriens C. et al., 2008), senza che sia necessaria alcuna modifica agli stessi; mentre potrebbe essere utilizzato in percentuali significativamente maggiori, prossime all'85%, con l'apporto di alcune modifiche. Il Brasile la produzione nel

2008 si aggirava attorno ai 17 milioni di litri/anno, mentre negli Stati Uniti era addirittura attorno ai 20 milioni di litri/anno (Beriens C. et all., 2008), con un crescente aumento un po' in tutto il mondo (vedi figura 1.1.2). Anche in Europa la produzione di biocombustibili negli ultimi anni è aumentata, mostrando un incremento, pari al 300%, nella produzione del bioetanolo tra il 2000 e il 2005, anche se l'estensione delle colture destinate alla produzione di bioetanolo, non è aumentata di molto, arrivando a coprire appena il 2% delle terre agricole, coltivate per produrre biocombustibili, dell'UE. Questo dato è notevolmente differente da quello del biodiesel, che mantiene la sua percentuale coltivata attorno all'81,5% delle terre agricole coltivate per produrre biocombustibili (Fonte INEA 2008).

Paese	Anno 2008	%
USA	8,93	43,80
Brasile	6,90	33,90
China	1,02	5,00
India	0,61	3,00
Francia	0,40	1,90
Canada	0,26	1,30
Germania	0,22	1,10
Tailandia	0,15	0,70
Russia	0,15	0,70
Spagna	0,13	0,60
Sud Africa	0,11	0,50
Regno Unito	0,11	0,50
Resto del mondo	1,40	6,90
Totale	20,37	100,00

Tabella 1.1.2 Milioni di galloni/anno di bioetanolo prodotti al mondo, con specifica dei volumi prodotti dai primi tredici paesi e relativa percentuale.

Il **biogas** è considerato un carburante gassoso pulito, semplice e versatile. Viene definito come una miscela di metano e anidride carbonica, derivante dalla digestione anaerobica della biomassa, dei fanghi di provenienza fognaria, dei rifiuti animali e degli scarichi di tipo industriale. La digestione anaerobia avviene

in assenza di aria e tempi relativamente lunghi, solitamente attorno a qualche settimana. Molti impianti utilizzano, negli impianti per la produzione del biogas, gli escrementi animali o i reflui fognari.

La composizione del biogas (Person M. et all., 2010), è definita in letteratura come si vede nella tabella 1.1.2 riportata di seguito.

I composti principali sono il metano, CH₄, il diossido di carbonio, CO₂, che da soli costituiscono il 90% del volume, a cui si aggiungono piccole quantità di solfuro di idrogeno di ammoniaca ed altri costituenti in tracce (vedi composizione in tabella 1.1.3).

Composition and parameters of gas from different sources					
PARAMETER	UNIT	LANDFILL GAS	BIOGAS FROM AD	NORTH SEA NATURAL GAS	DUTCH NATURAL GAS
Lower heating value	MJ/nm ³	16	23	40	31,6
	kWh/nm ³	4,4	6,5	11	8,8
	MJ/kg	12,3	20,2	47	38
Density	kg/nm ³	1,3	1,2	0,84	0,8
Higher Wobbe index	MJ/nm ³	18	27	55	43,7
Methane number		> 130	>135	70	-
Methane	vol-%	45	63	87	81
Methane, variation	vol-%	35-65	53-70	-	-
Higher hydrocarbons	vol-%	0	0	12	3,5
Hydrogen	vol-%	0-3	0	0	-
Carbon oxide	vol-%	0	0	0	0
Carbon dioxide	vol-%	40	47	1,2	1
Carbon dioxide, variation	vol-%	15-50	30-47	-	-
Nitrogen	vol-%	15	0,2	0,3	14
Nitrogen, variation	vol-%	5-40	-	-	-
Oxygen	vol-%	1	0	0	0
Oxygen, variation	vol-%	0-5	-	-	-
Hydrogen sulphide	ppm	< 100	< 1000	1,5	-
Hydrogen sulphide, variation	ppm	0-100	0-10000	1-2	-
Ammonia	ppm	5	<100	0	-
Total chlorine (as Cl ⁻)	mg/nm ³	20-200	0-5	0	-

1.1.3 Tabella, tratta da (Persson M. et all., 2006), relativa alla composizione del biogas.

I componenti principali sono entrambe gas serra, ma, mentre la CO₂ viene riassorbita e riciclata dalle piante, il CH₄ non è coinvolto in nessun processo e una volta in atmosfera ha un potere come gas serra fino a venti volte superiore alla CO₂.

Quindi questo riutilizzo dei gas prodotti biologicamente permette un doppio vantaggio, ossia quello di produrre carburanti e quello di diminuire le emissioni di gas serra in ambiente.

Numerosi paesi del nord Europa, come la Danimarca, la Germania o anche la Svezia, hanno sviluppato e messo in funzione numerosi impianti per la produzione del biogas negli ultimi decenni, certamente agevolati dalle grandi disponibilità di biomassa che questi paesi hanno. Molti di questi impianti sono in grado di trattare, da un minimo di 2000-4000 tonnellate annue di biomassa, ad un massimo di 36.000 tonnellate annue ,per singolo impianto (Gebrezgabher S.A. et al., 2010) determinando così rese produttive considerevoli.

Le rese ottenute nella produzione di biogas dalla biomasse, sono riportate in bibliografia attorno a 0.5 m^3 di biogas per kg di alga, e questi gas sono composti al 62.5% in CH_4 (Gavrilescu M. et al., 2005), mentre nel caso della biomassa terrestre le rese si aggirano attorno ai $0.3\text{--}0.37 \text{ m}^3$ di biogas per kg di biomassa, con il metano (CH_4) al 70% (Samson R. et al., 1982).

Il **bioidrogeno**, che va ricordato non essere un combustibile classico, ma bensì un vettore energetico, è solitamente ottenuto attraverso processi elettrolitici dall'acqua e rappresenta perlopiù una metodologia di stoccaggio energetico. Attualmente l'idrogeno non bio- viene prodotto industrialmente solo attraverso processi di reforming del gas naturale, processi di gasificazione del carbone e processi di elettrolisi dell'acqua. Ad attirare in questa direzione è il fatto che l'idrogeno è un combustibile in grado di conciliare il consumo energetico e il rispetto per l'ambiente, con una combustione pulita ed efficace allo stesso tempo, 141 MJ/Kg e senza alcuna emissione di CO_2 .

Il bioidrogeno non è altro che l'idrogeno di derivazione biologica, prodotto attraverso processi di fermentazione batterica o di produzione spontanea da parte di specifiche specie algali. Nello specifico, esistono molti microrganismi batterici che sono in grado di produrre idrogeno se sottoposte a particolari condizioni di luce, così come esistono anche altre specie che sono in grado di produrlo, se sottoposte a determinate condizioni di buio.

Ne sono un esempio, alcuni batteri del genere *Clostridium* così come altri del genere *Caldicellulosiruptor* o del genere *Thermoanaerobacter* o il genere *Thermotoga*.

Per quanto riguarda le microalghe, invece, il processo alla base è la biofotolisi dell'acqua che avviene all'interno delle microalghe (Benemann J.R. et al., 2000). L'inibizione, attraverso una riduzione del potenziale redox per mezzo della ferredoxina, della fase di water spilling (PSII) durante la biofotolisi, al fine di non permettere all'idrogeno la reazione con l'ossigeno a formare nuova acqua. Questo permette la produzione di H^{\cdot} che, attraverso una successiva reazione di idrogenazione ($H^{\cdot} + H^{\cdot} \rightarrow H_2$), permette di produrre bioidrogeno (H_2). Metodo alternativo a questo, è quello che prevede di utilizzare lo zolfo come accettore di elettroni, sempre al fine di indurre il calo di potenziale redox necessario a inibire la reazione PSII (Benemann J.R. et al., 2000).

Un caso intermedio tra le due possibilità sopra illustrate è quella descritta da Arnon et al. nell'articolo del 1961, in cui viene descritta l'esistenza di un'alga che, in combinazione con un particolare batterio, è capace di produrre idrogeno (Rosenberg J.N. et al., 2008).

Le microalghe capaci di produrre bioidrogeno, maggiormente citate in letteratura, sono ad esempio la *Chlamydomonas reinhardtii*, la *Chlorella sorokiniana*, la *Chlorella salina* e la *Scenedesmus obliquus* (Chader S. et al., 2009; Samorì C. et al., 2010).

E' un esempio di alta efficienza, la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, che è in grado di convertire efficacemente l'energia luminosa in energia destinata alla biofotolisi., con un resa caratterizzata da un'efficienza pari al 22 % (Samorì C. et al., 2010).

La possibilità di produrre bioidrogeno dalle microalghe era nota sin dagli anni ottanta, ma era stata accantonata, poiché la sua produzione era troppo costosa se confrontata con i costi di produzione dei combustibili classici (Posten C. et al., 2009).

Oggi, invece al crescere continuo del prezzo del greggio, questa tecnologia è stata riscoperta e attraverso l'utilizzo di nuove tecnologie, come l'elettrolisi attivata da celle fotovoltaiche, è possibile produrre bioidrogeno a costi contenuti, inferiori a venti \$ / GJ, e senza usare energia da fonti fossili.

1.2 – L’evoluzione dei biocombustibili.

I biocombustibili hanno avuto una diversificazione tecnologica partendo dai primi prodotti, principalmente derivanti da colture di natura oleaginosa, passando poi a quelli derivati dalle materie ligneo-cellulosiche ed arrivando, infine, ai biocombustibili prodotti da colture modificate geneticamente o di tipo algale.

Quest’evoluzione si è articolata idealmente in tre generazioni di combustibili.

La **prima generazione di biocombustibili** è stata prodotta a partire da colture specifiche, solitamente di natura oleaginosa o zuccherina, classicamente ad uso esclusivo alimentare (mais, colza, palma, grano, barbabietola, canna da zucchero, etc.).

La necessità di rimpiazzare i combustibili di origine fossile, con combustibili rinnovabili, ha spinto la ricerca a trovare nuove fonti e nuove tecnologie per la produzione di combustibili. Mentre in seguito, l’impatto negativo avuto sull’economia e sull’agricoltura e l’incapacità, dei prodotti trovati, di soddisfare la domanda di combustibili, hanno spinto la ricerca a continuare, con l’obiettivo di trovare prodotti e tecniche più funzionali ed efficienti, capaci di evitare un utilizzo improprio dei terreni agricoli (Williams P.J.L. et al., 2007).

Così, seguendo l’idea di utilizzare delle risorse non sfruttate, come potevano essere le materie ligneo-cellulosiche di derivazione agro-forestale, ha permesso di identificare la nuova risorsa per i biocombustibili. Questi vengono definiti come **biocombustibili di seconda generazione**.

Data la natura recalcitrante delle materie lignocellulosiche, si studiano tecniche di degradazione termochimica come la pirolisi, la liquefazione e la gassificazione, che sono state capaci di creare nuovi prodotti ad uso energetico e processi chimici e biochimici per la conversione della cellulosa in glucosio per la fermentazione, al fine di trasformare quello che fino a quel momento era solo un residuo da smaltire in una risorsa.

La **terza generazione di biocombustibili**, infine, ha sviluppato le tecniche di lavorazione delle prime due generazioni, l'estrazione chimica e fisica, dei prodotti di prima generazione, e la pirolisi e la gassificazione, sviluppati con la seconda, sulle nuove biomasse, organismi geneticamente modificati e biomassa algale.

La modifica genetica delle biomasse, come nel caso del pioppo, con l'impoverimento di lignina nella corteccia o delle microalghe, al fine di aumentarne la produzione di lipidi, o addirittura la produzione degli idrocarburi, ha permesso di portare ai massimi le rese.

Quest'ultima generazione ha portato a un incredibile aumento delle rese, già solo con il fatto che sono state utilizzate le biomasse algali, come si vede nella tabella 1.2.1, poiché queste sono caratterizzate da una resa della produzione di biomassa nettamente maggiore, rispetto a qualsiasi altra coltura.

Se poi si contano anche l'abbassamento dei costi per la produzione, l'abbassamento dei costi relativi alle aree da utilizzare per la loro coltura e la possibilità di sfruttare terreni altrimenti inutilizzabili, vista l'insospitalità degli stessi, i benefici risultano ulteriormente accresciuti rispetto ai costi.

Crop	Oil yield (L/ha)	Land area needed (M ha)	Percent of US cropping area
Mais	172	1540	846
Soia	446	594	326
Canola	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Cocco	2689	99	54
Palma	5950	45	24
Microalgae b	136900	2	1.01
Microalgae c	58700	4.05	2.05

1.2.1 Tabella comparativa delle produzioni di biodiesel negli US derivante dalle diverse colture.

Le colture sono confrontate per produzione (L/ha), area utilizzata (land area (M ha)), percentuale dell'area dedicata a tale coltura, utilizzata per biocombustibili negli US (Percent of US cropping area).

La tabella 1.2.1 è tratta dall'articolo di A. Demyrbas et al., 2008, mostra le produzioni di biodiesel negli USA nell'anno 2007, espressi come L/ettaro e relazionati al numero di ettari (M ha) coltivati con ciascuna coltura. Il fine è quello di evidenziare il confronto delle colture terrestri con quelle algali.

1.3 – I biocombustibili da microalghe.

L'utilizzo delle biomasse di derivazione algale, ha da subito evidenziato dei sostanziali benefici connessi dal loro utilizzo, rispetto all'utilizzo delle biomasse terrestri.

In primo luogo, le biomasse algali, hanno un'efficienza fotosintetica notevolmente maggiore rispetto a quella delle piante terrestri, stimata per le alghe attorno al 5% della luce disponibile, mentre è attorno all'1,5% per le biomasse terrestri (Posten C. et al., 2009).

In secondo luogo, le loro caratteristiche, permettono di porre gli impianti per la coltivazione in aree inospitali, che solitamente non potrebbero essere utilizzate in alcun modo e sarebbero considerate quindi marginali alle aree coltivate o inutilizzate. Un esempio ne sono le aree sterili e i deserti, o più genericamente le zone aride.

Un ulteriore vantaggio, associato all'utilizzo delle microalghe per la produzione di biocombustibili, è la possibilità di accoppiare le attività industriali, produttrici di CO₂, agli impianti per la coltivazione delle alghe. Il risultato ricercato con questo accoppiamento è quello di ottenere l'abbattimento della CO₂ in uscita dalle industrie.

Una simile procedura, sarebbe in grado di aumentare le rese delle colture algali e di minimizzare gli impatti ambientali delle industrie, che sono la fonte di gas serra, responsabili dei cambiamenti climatici (Samorì C. et al., 2010).

La presenza di innumerevoli specie algali e la relativa semplicità nella manipolazione genetica, sono altri vantaggi delle biomasse algali, rispetto alle terrestri, per la produzione dei biocombustibili (An J.Y. et al., 2003).

La possibilità di modificare geneticamente le microalghe è un aspetto studiato ampiamente e che sembra essere la via più promettente per la produzione di biocombustibili dalle biomasse nel prossimo futuro.

Gli obiettivi delle ricerche genetiche, riguardano la possibilità di rendere le alghe più resistenti, o più produttive o addirittura capaci di produrre specifiche frazioni

lipidiche, come ad esempio la frazione idrocarburica (Rosenberg J.N. et al., 2008; Shen Y. et al., 2008).

Le specie che destano particolare interesse e sono quelle caratterizzate, naturalmente, da elevati contenuti di idrocarburi nella frazione lipidica. Di solito queste appartengono al gruppo delle alghe verdi e sono, per loro natura, diffusione e semplicità di coltivazione, quelle più studiate (Hu Q. et al., 2008).

Un esempio interessante è la specie *Botryococcus braunii*, che è stata al centro degli studi incrociati svolti in diversi laboratori del mondo, il cui studio ha prodotto dei risultati piuttosto interessanti.

1.4 – Le metodologie di conversione.

L'estrazione e transesterificazione dei lipidi.

L'estrazione avviene utilizzando procedimenti sia fisici che chimici per separare la frazione lipidica dal residuo solido della biomassa.

Lo scopo dell'estrazione con solvente è quello di separare gli acidi grassi liberi dalla biomassa per permettere, in un processo successivo, la loro conversione nei rispettivi acidi grassi metilati.

Le estrazioni sono possibili sia sulle biomasse algali umide che su quelle essiccate, anche se le difficoltà e problemi tecnici da risolvere, nei due casi, sono ben diverse fra loro. Infatti, per estrarre i lipidi dalle biomasse ancora umide, è necessario valutare le interazioni esistenti tra il solvente e l'acqua, poiché quest'ultima spesso in maniera indiretta è capace di ridurre le capacità estrattive.

Ad esempio, nell'estrazione dei lipidi di *Botryococcus braunii* ancora umida, è stato necessario utilizzare l'esano come solvente, poiché è insolubile in acqua, e un trattamento termico a 100-120° C, per riuscire ad estrarre gli idrocarburi contenuti nell'alga (Kita K. Et al., 2010).

La possibilità di estrarre campioni ancora umidi, permette di risolvere il problema dell'essiccazione dei campioni, anche è necessario usare solventi insolubili in acqua. La letteratura enumera numerosi sistemi solventi convenzionali.

Questi includono il metodo/procedura di Folch, che consiste in una miscela di cloroformio/metanolo in proporzione 2:1 (Folch J. et al., 1957), l'estrazione sequenziale, messa appunto dallo studioso Franz Von Soxlet, con il dietiletere (Soxlet F. et al., 1879) e l'estrazione lipidica ad opera della soluzione di etanolo/dietiletere messa appunto da Sheppard (Sheppard A.J., 1963).

L'uso di una miscela di cloroformio-metanolo (Folch J. et al., 1957; Bligh E.G., Dyer W.M., 1959) è ampiamente utilizzata soprattutto in campo analitico.

Inoltre sono usati anche altri solventi, come l' MTBE, il Metil-Ter-Butil Etere (Matyash V. et al., 2008) e la miscela di esano/isopropanolo (Hara, A. et al., 1978).

Per campioni umidi, ci sono il metodo messo a punto da Bligh e Dyer, variante del metodo di Folch, che prevede una miscela di cloroformio/metanolo in proporzione 1:2, seguita da un ulteriore passaggio di 1,25 volumi di cloroformio e un successivo passaggio di 1,25 volumi di H₂O, per campioni con al massimo 1 mL di H₂O (Bligh E.G., Dyer W.M., 1959).

Inoltre è risultato, da studi simili, che il DMC è in grado di estrarre i lipidi già dalla biomassa ancora umida (Tundo P. et al., 2002) e inoltre metila, in catalisi basica, gli acidi liberi e in presenza di metanolo transesterifica anche i trigliceridi (Shieh W.C. et al., 2002).

Recentemente nel nostro laboratorio sono stati testati solventi a polarità modulata (Switchable Polarity Solvents) per l'estrazione dei lipidi dalle alghe (Samorì C. et al. 2010).

L'estrazione delle biomasse algali, prevede un ulteriore trattamento per dare una frazione definibile come biocarburante, poiché queste contengono una componente di triacilgliceroli (Rodolfi L. et al., 2009). I triacilgliceroli devono essere trattati chimicamente, poiché sono la causa dell'alta viscosità dell'olio, della formazione delle schiume sulla sua superficie.

La transesterificazione degli acidi grassi, risulta quindi essenziale per ottenere i biocombustibili, converte gli acidi grassi legati al glicerolo in esteri metilici/etilici a più basso peso molecolare (Bondioli P. et al., 2010). Esistono diversi approcci in merito.

La procedura acido catalizzata con una proporzione 1:1 catalizzatore/olio e 56:1 metanolo/olio è stata testata su *Chlorella prototecoides* (Miao X. et al., 2006) e una metanolisi acida, con eccesso di metanolo, seguita da una transesterificazione basica catalizzata è stata effettuata su *Zanthoxylum bungeanum*, una biomassa terrestre ricca in acidi grassi liberi che proprio per questa sua caratteristica necessita di una catalisi acida (Canakci M. et al., 2008).

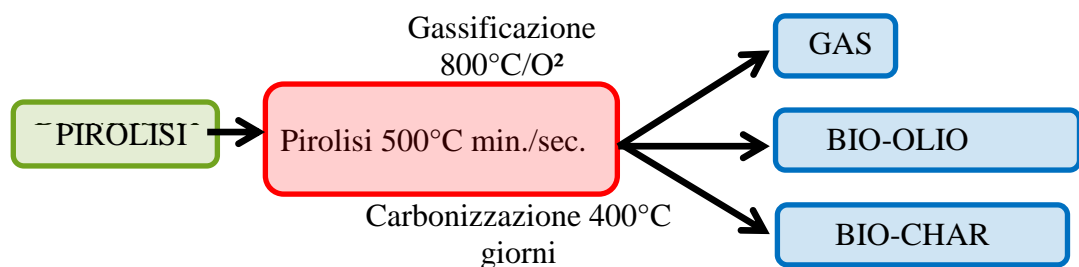
Pirolisi

La pirolisi è un processo di degradazione termochimica della biomassa a temperature maggiori di 300° C e in assenza di agenti ossidanti, che permette di ottenere una frazione liquida aventi caratteristiche intermedie tra gli oli vegetali (olio di oliva) e il petrolio, sia per viscosità che per potere calorifico.

Sviluppata a partire dagli inizi degli anni settanta (Appell H.R. et all., 1980), la pirolisi viene effettuata in condizioni di atmosfera inerte, ad esempio, sotto flusso di azoto e produce, in seguito a processi di decomposizione e eliminazione di tipo radicalico, frammenti delle molecole di partenza caratterizzati da bassi pesi molecolari.

Il prodotto liquido che si ottiene è di natura oleosa ed è caratterizzato da alta viscosità, insolubilità in acqua e solubilità nei solventi (Demirbas A. et all., 1995), mentre una frazione minore viene trasformata in gas e in ceneri.

Esistono diverse tipologie di pirolisi, differenziate tra loro in base alle temperature utilizzate e ai tempi utilizzati. La pirolisi definita come “slow”, viene da sempre utilizzata per la produzione del carbone vegetale, e prevede calore minore e tempi più lunghi, mentre invece la tecnica “fast” e quella “flash”, finalizzate alla produzione di tar o bio-olio da materiali, utilizzano alte temperature per tempi di residenza estremamente ridotti.



1.5.1 Schema prodotti di pirolisi.

La pirolisi crea i suoi prodotti attraverso processi di craking termico, che avvengono quando il campione è sottoposto a temperature comprese tra 350 e 700° C.

La presenza controllata di aria, e quindi di agenti ossidanti, determina un cambiamento nel processo termochimico trasformando la pirolisi in una gassificazione, che ha lo scopo di trasformare la biomassa in miscela tipo “syngas”. Questo prodotto, è tipicamente composto da una miscela ben definita di azoto (50%), di idrogeno (15-20 %), di metano (3-5 %) e di mono- e di-ossido di carbonio equamente divisi.

Ulteriore variante, alternativa alla pirolisi è la liquefazione, che sfruttando un pre-trattamento chimico, permette di produrre un liquido a partire dalla biomassa. I liquidi prodotti attraverso la liquefazione sono ad esempio il metanolo, l’etanolo o alcuni olii pesanti (APAT 2003).

L’applicazione di questa tecnica alle biomasse algali permette di ottenere risultati comparabili a quelli ottenuti con le classiche estrazioni. Un esempio è *Dunaliella toriolecta*, che a partire da un contenuto lipidico pari al 20 % della biomassa essiccata, se liquefatta, restituisce un olio con una resa pari al 37 %, caratterizzato da un potere calorifico di 27 MJ/kg (Minowa T. et al., 1995).

Nannochloropsis sp., invece, pirolizzata alla temperatura di 350° C, ha dato una resa in olio del 43% in peso rispetto alla biomassa essiccata, con un potere calorifico pari a 39 MJ/kg, partendo da un contenuto lipidico estraibile pari al 29% in peso (Brown T.M. et al., 2010).

Un’altra alga, *Botriococcus braunii*, trattata a 200-300° C, ha prodotto un olio di pirolisi, con una resa del 54-67% in peso, caratterizzato da un potere calorifico particolarmente elevato, pari a 49 MJ/kg (Dotea Y. et al., 1994).

Altri studi condotti su campioni di *Chlorella protothecoides*, tramite flash pirolisi, hanno mostrato una resa del 19-23%, partendo da una frazione lipidica estraibile del 15%. Nel caso invece di *Mycrocystis euraginoso*, i valori ottenuti sono stati del 13% (Miao X. et al., 2004).

Come evidenziato dal caso di *Chlorella protothecoides* è possibile avere alte rese pirolitiche, pur avendo contenuti lipidici non troppo elevati, fino a tre volte il peso della frazione lipidica.

I principali problemi riscontrati negli olii di pirolisi, sono gli alti contenuti in azoto, compresi tra un minimo del 4 % fino ad un massimo del 8 %, e la presenza di alti contenuti in ossigeno che sono in grado di dar vita a composti ossigenati, estremamente dannosi (NO_x , SO_x).

I bio-oli da pirolisi delle microalghe possono presentare il contenuto di ossigeno equivalente più basso, rispetto a quelli presenti negli oli di pirolisi ottenuti dai materiali ligneocellulosici, ma non sono ancora sfruttabili come carburante nonostante dotati di un potere calorifico interessante che si aggira attorno ai 30 MJ/kg (Miao X. Et al., 2004).

Capitolo 2 – Scopo della tesi.

Questa tesi si inserisce nel più ampio contesto dello studio delle biomasse algali, finalizzato alla definizione delle specie adatte alla generazione di biomasse per la produzione di biocombustibili. Questo studio va quindi ad affiancarsi a molti altri per definire il panorama delle microalghe studiate come fonte alternativa da cui ottenere combustibili alternativi a quelli fossili.

Lo scopo della mia tesi è il confronto, attraverso uno studio biologico e chimico-analitico, di tre diverse alghe aventi caratteristiche significativamente diverse anche relativamente al comparto acquatico in cui vivono (salinità).

Il piano di lavoro della tesi si è articolato in diverse fasi:

- Selezione delle microalghe;
- Coltivazione e monitoraggio della crescita con metodi convenzionali (spettroscopia) e pirolisi analitiche;
- Raccolta ed essiccazione delle microalghe per ottenere la biomassa;
- Analisi della composizione chimica delle biomasse algali;
- Estrazione delle frazioni lipidiche e analisi degli esteri metilati degli acidi grassi (FAME). A tal fine sono stati messi a confronto due metodi di estrazione.

Tutte queste analisi saranno eseguite al fine di individuare l'alga che, presentando i maggiori vantaggi, potrà essere selezionata per essere studiata preliminarmente utilizzando il metodo della pirolisi.

Tramite l'impiego di metodi estrattivi e pirolitici mira a definire, attraverso la definizione delle qualità di diverse specie algali, vuole considerare il possibile utilizzo del residuo, proveniente dall'estrazione lipidica, in un'ottica di un potenziale utilizzo di queste biomasse per la produzione di biocombustibili.

.

Capitolo 3 – Caratteristiche delle alghe selezionate.

Lo studio analitico dei processi di estrazione e di pirolisi delle biomasse algali, condotto in questa tesi, è stato finalizzato al confronto di tre specie potenzialmente adatte alla produzione di biocombustibili.

Tra le diverse specie di microalghe, disponibili presso il laboratorio di algologia, sono state scelte le tre specie *Scenedesmus sp.*, *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina*.

Queste specie vengono utilizzate in diversi processi industriali, un aspetto le rende interessanti, dal punto di vista del riutilizzo delle biomasse residue derivanti dai processi di lavorazione.

Un altro aspetto che differenzia le tre specie micro-algali selezionate, consiste nel diverso valore salinità del comparto acquatico in cui vivono, che varia da 0,5 ‰, per *Scenedesmus sp.*, a 200‰, per *D. salina*.

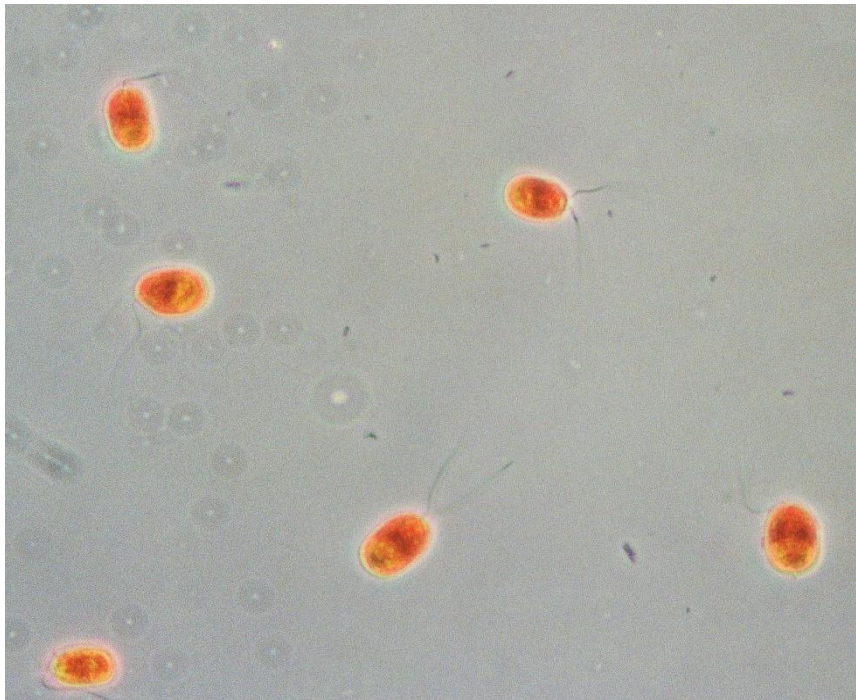
Questo può essere importante in quanto le condizioni di salinità definiscono le aree che possono essere interessate nelle coltivazioni. Inoltre, il sale residuo influenza i processi di essiccazione, estrazione e di pirolisi.

3.1 – *Dunaliella salina*.

Dunaliella salina è una microalga della classe delle Chlorophyceae (vedi figura 3.1.1, tratta dalla Review di Aharon Oren; “A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005”). E’ un tipico esempio di microalga unicellulare alofita, ovvero un organismo capace di incredibili adattamenti alle più estreme condizioni di vita, come, ad esempio, l’alta salinità. Quest’alga, solitamente, si trova nelle acque ipersaline, tipiche dei laghi salati o delle saline, poiché può sopportare elevate variazioni di salinità, con un optimum compreso fra 50 ‰ e i 200 ‰ (per confronto si tenga presente che la salinità del Mar Adriatico è 35 ‰).

Quest’alga, nello specifico è stata isolata dal laboratorio di algologia di Ravenna da un campione prelevato presso le saline di Cervia.

Dunaliella salina è nota per le sue proprietà sin dal 1905 (Oren A. et al., 2005), quando fu scoperto il suo alto contenuto di carotenoidi, che sono molto importanti sia nell’alimentazione, che per la loro azione naturale anti-ossidante, sfruttata molto anche per i prodotti commerciali, come gli integratori e i cosmetici.



3.1.1 - Immagine di *Dunaliella salina*, in cui risultano evidenti i flagella deputati al movimento.

Nello specifico, la condizione ambientale in cui vivono, caratterizzata da alti tassi di evaporazione e forte irraggiamento solare, impongono all'alga di elaborare strategie difensive, sia dal punto di vista dell'osmoregolazione, sia da quello della protezione da un eccessivo irraggiamento, quale quello presente nelle acque basse.

E' per questi motivi che l'alga produce alte concentrazioni di gliceroli e caroteni. Il glicerolo, ha la funzione di permettere alle microalghe di affrontare l'elevato potenziale osmotico, dato dall'alta salinità, mentre le notevoli concentrazioni di carotenoidi, nello specifico di β -carotene, hanno la funzione di migliorare le capacità, delle microalghe, di schermarsi dall'intensa luce solare. La presenza di una così ricca frazione lipidica coincide con quanto si legge in letteratura, tant'è che proprio quest'alga viene utilizzata da molti anni, come fonte da cui estrarre i carotenoidi, soprattutto per settori come quello farmaceutico e quello cosmetico (Coban Y. et al., 2000; Weldy C.S. et al., 2007).

Gli impianti di coltivazione di *Dunaliella*, nel mondo, si sono ampiamente diffusi, e nel tempo si sono evoluti e modificati rispetto ai primi impianti, come quello che fu creato nell'ex-URSS nel 1966 (Oren A. et al., 2005). Al giorno d'oggi, la coltivazione si basa su impianti intensivi e tecnologicamente avanzati, presenti soprattutto in Israele e Australia.

3.2 – *Scenedesmus* sp.

Scenedesmus sp., è un alga di acqua dolce, interessante perché altamente efficiente nel contesto della fitodepurazione.

Quest'alga fa parte della classe delle Chlorophyceae, o alghe verdi, che sono ricche di cromatofori al loro interno (Tomas C.R. et al., 1996) ed è stata isolata da un laghetto naturale nella provincia di Forlì-Cesena.

A differenza di *D. salina*, *Scenedesmus* sp. può presentarsi sia in forma unicellulare che coloniale, formando filamenti, lamine o ammassi.

Solitamente è strutturata in piccole colonie, che sono composte da 2 ad 8 cellule, cementate fra loro da una sostanza gelatinosa. Agli estremi, di questi piccoli raggruppamenti, si trovano, due coppie di spine, che sono diritte o arcuate e molto resistenti.

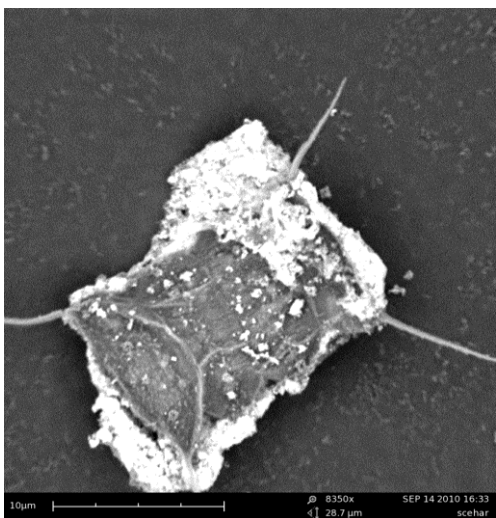
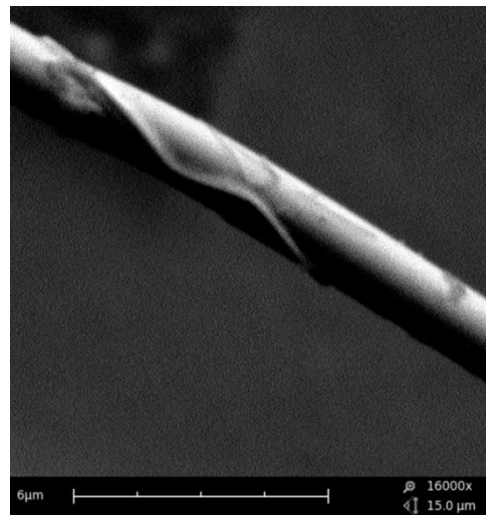
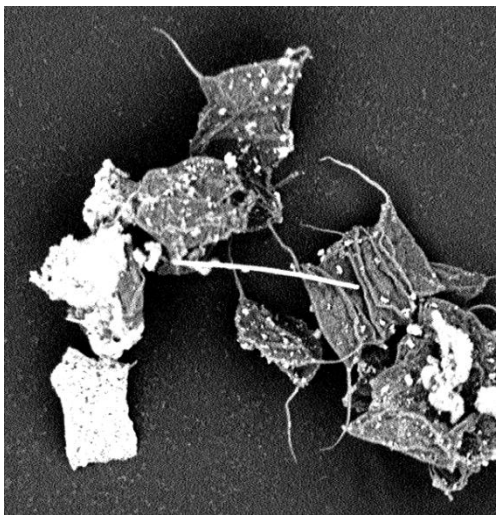
Di forma cellulare allungata, arrotondata o cilindrica, *Scenedesmus* (figura 3.2.1, immagine scattata dal laboratorio di algologia CIRSA) è caratterizzata solitamente da una parete di rivestimento di natura cellulosa ed è generalmente fornita di due, quattro o otto flagelli, deputati con la loro azione sincrona a determinarne il movimento, lento e a zig-zag.



3.2.1 *Scenedesmus* sp. con evidenti le quattro cellule e le spine.

Scenedesmus sp. (Vedi immagine 3.2.2 di *Scenedesmus sp.*, ottenuta con il SEM, del laboratorio di chimica di Bologna) presenta alti contenuti di clorofille e pigmenti, tra cui spiccano sia α - che β -caroteni, oltre ad alcune xantofille. Nelle cellule questi composti sono concentrati in vescicole, come materiale di riserva di tipo oleoso. Inoltre sono tipicamente organismi fotosintetici, che però, all'occorrenza in assenza di luce, possono comportarsi da chemio-autotrofi.

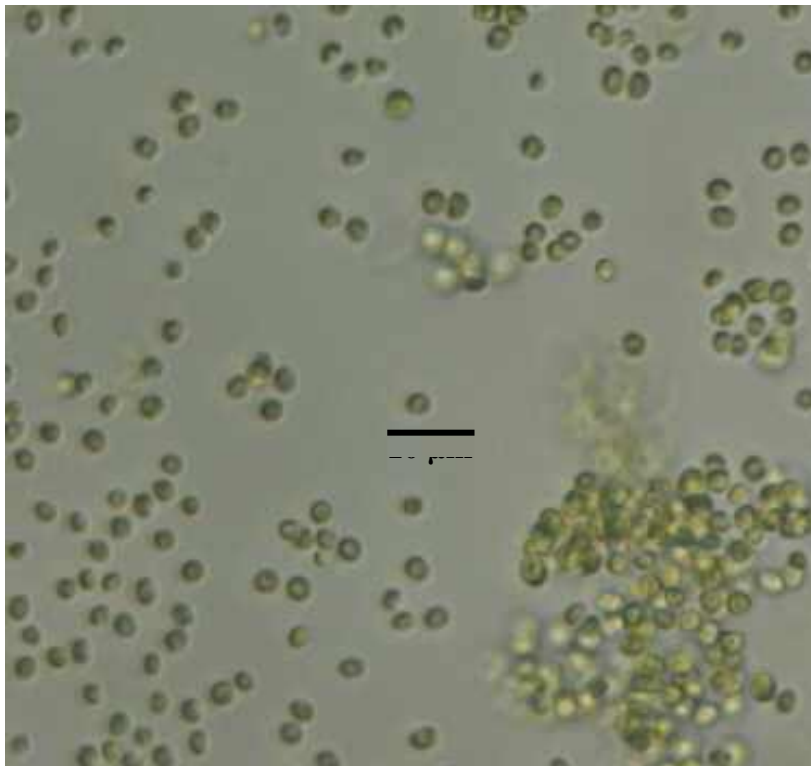
Quest'alga è stata scelta proprio per gli studi condotti in passato, in relazione alle sue grandi capacità di assorbire nutrienti dalle acque. Questo fattore l'ha spesso indicata come alga potenzialmente interessante per processi di fito-depurazione, così come per quelli di bonifica, che per quelli legati all'abbattimento naturale dei nutrienti nei siti di depurazione dei reflui (Mulbry W., 2009).



3.2.2 Queste immagini mostrano, in alto a sinistra, gli aggregati coloniali di *Scenedesmus* disidratati dopo le estrazioni; in alto a destra, un ingrandimento di una spina dell'alga, certamente non di natura carboniosa, poiché non sarebbe potuta sopravvivere alla procedura per la determinazione del materiale inorganico di combustione, a 700° C. Infine, in basso, una singola cellula di *Scenedesmus* delle dimensioni di 15x10 μm.

3.3 – *Nannochloropsis gaditana*.

Nannochloropsis gaditana (vedi figura 3.3.1, immagine scattata dal laboratorio di algologia CIRSA), è una microalga appartenente alla classe delle Eustigmatophyceae (Hibberd et al., 1981) (Rocha J.M.S. et al., 2003). Al genere appartengono sia organismi di acqua dolce che di acqua salata. Nello specifico, *Nannochloropsis gaditana* è un'alga di acqua salata (S=35 ‰), dalle piccole dimensioni (\varnothing 2 μ m), di forma sferica e del tutto priva di flagelli o organi di movimento. Inoltre, come le altre della stessa classe, non presentando particolari caratteri distintivi, non è facilmente riconoscibile, se non con tecniche genomiche di sequenziazione del DNA. E' priva delle clorofille di tipo "b" e di tipo "c", mentre è ricca di pigmenti, quali astaxantina, zeaxantina e cantaxantina e di acidi grassi liberi polinsaturi, come ad esempio alcuni omega-3 e omega-6 (Graham e Wilcox et al., 2000).



3.3.1 Nella figura si vede *Nannochloropsis gaditana*.

L'alga utilizzata per questa tesi proviene dalla collezione del "Provasoli-Guillard national center for culture of marine phytoplankton" che ha sede presso il "Bigelow laboratory for ocean sciences" West Boothbay Harbor, Maine (USA).

Questa tipologia di micro-alga è già utilizzata a livello industriale, sia come mangime per organismi allevati in acquacoltura, quali larve di pesci e i rotiferi, sia come fonte di acidi grassi polinsaturi del tipo omega-3, -6 utilizzati sia a livello farmaceutico che nella preparazione degli integratori alimentari.

La presenza di alti livelli di lipidi, la rende estremamente interessante dal punto di vista di un utilizzo a scopo industriale-energetico. Infatti la presenza di numerosi depositi di natura oleosa, così come la particolare tipologia di acidi grassi accumulati, sono tra gli elementi ricercati nelle alghe studiate a scopo energetico.

Capitolo 4 – Materiali & metodi.

4.1 – Coltivazione.

La prima fase, quella della coltivazione, è quella che mira a ricreare condizioni ideali per la crescita e lo sviluppo, facendo sì che la coltura si trovi nelle migliori condizioni di nutrienti, temperatura e luminosità.

Ogni alga è stata inoculata in un terreno capace di assicurarle le condizioni migliori per quanto riguarda la concentrazione dei sali e dei nutrienti e le colture sono state messe all'interno di una camera termostata, caratterizzata da una temperatura costante ($20\pm 1^\circ\text{C}$) e da un impianto di illuminazione, a luci fredde, capace di illuminare le colture a differenti intensità luminose.



Fig. 4.1-1 *Nannochloropsis gaditana* nella camera termostata, a temperatura e luminosità costanti.

Per ognuna delle tre colture studiate sono stati utilizzati condizioni diverse fra loro in base alle diverse caratteristiche delle tre alghe.

Il terreno utilizzato per *Scenedesmus sp.*, un'alga di acqua dolce, è stato il terreno CHU 13 modificato, mentre per le altre due alghe, è stato utilizzato il terreno F/2. In questo caso sono state utilizzate due diverse salinità di crescita: 35‰ per *Nannochloropsis Gaditana*, e 200‰ per *Dunaliella Salina*.

Il terreno CHU 13 modificato è stato creato dal Dott. S.P. Chu negli anni quaranta del ventesimo secolo, e la sua prima pubblicazione risale al 1942 (Largeau C. et al., 1980; Chu S.P. et al., 1942).

La composizione è stata studiata per permettere la crescita di alghe fototrofe, tanto da essere al giorno d'oggi uno dei terreni maggiormente utilizzati per la coltivazione di alghe di acqua dolce.

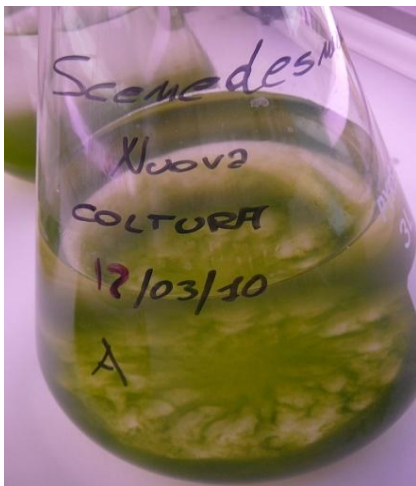
La sua composizione prevede la presenza di numerosi sali, contenenti tutti gli elementi essenziali per la crescita, come ad esempio, macronutrienti, azoto e fosforo, ma anche micronutrienti come calcio, magnesio, rame, ferro, zinco e altri, riportati nello specifico nella tabella 4.1.2, dove sono elencati in associazione alle rispettive concentrazioni finali espresse in g/L.

Sale	g/L
KNO ₃	0,2
K ₂ HPO ₄	0,04
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	0.08
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1
Citrato Ferrico	0,01
Acido Citrico	0,1
CoCl ₂	0,02
H ₃ BO ₃	0,5
MnCl ₂ tetrahydrate	0,5
ZnSO ₄ heptahydrate	0,05
CuSO ₄ pentahydrate	0,02
Na ₂ MoO ₄	0,02
0.072 N H ₂ SO ₄	1 drop

4.1.2 Composizione del terreno CHU 13 modificato, espressa in g su litro.

Il terreno viene preparato a partire da acqua deionizzata ($\sim 0,200 \mu\text{S}/\text{cm}$) a cui vengono aggiunti i sali secondo le proporzioni descritte nella tabella 4.1.2. Una volta preparata la soluzione, il pH viene portato a 7,5 per mezzo di una soluzione 0,5 M di NaOH. Infine il terreno CHU 13 viene sterilizzato in autoclave, per eliminare la componente batterica residua. Questo terreno è stato utilizzato per la coltivazione di *Scenedesmus sp.*(figura 4.1.3-a).

Il secondo terreno preparato è il terreno F/2, che è la rivisitazione della “ricetta” del Medium f studiata dal professor R.R.L. Guillard nel 1975. Questo terreno è la versione, ridotta di un mezzo, dell’originale metodo proposto per la coltivazione di specie algali marine e di diatomee dallo stesso professor R.R.L. Guillard e dal suo collega J.H. Ryther, nel 1962 (Guillard R.R.L. et al., 1962).

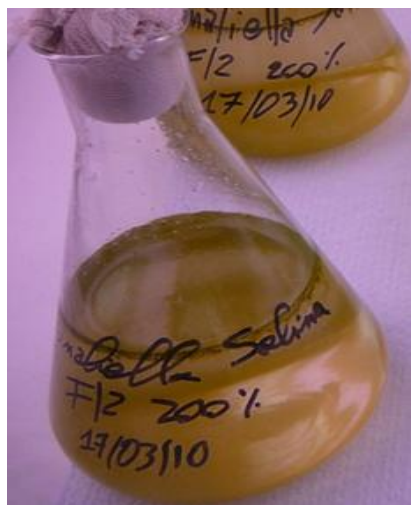


Scenedesmus Sp., CHU13 mod. (a)



Nannochloropsis Gaditana, (b)

F/2, S=35‰



Dunaliella Salina, (c)

F/2, S=200‰

Fig. 4.1.3

Le tre alghe in coltura.

Il terreno F/2 è stato utilizzato sia per la coltivazione di *Nannocloropsis gaditana* (figura 4.1.3-b) che per *Dunaliella salina* (figura 4.1.3-c). Il terreno F/2, la cui composizione è riportata nella tabella 4.1.4, differisce dall'originario f Medium per avere le quantità di tutti gli elementi pari a un mezzo e prevede anche la sostituzione del sequestrene ferrico, con l' $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e il $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Componenti Concentrazioni [M]		[M]
NaNO_3		8.82×10^{-4}
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		3.62×10^{-5}
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$		1.06×10^{-4}
Metalli in traccia in soluzione		-
Vitamine in soluzione		-
Metalli in traccia in soluzione madre Concentrazioni [M]		[M]
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		1.17×10^{-5}
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.17×10^{-5}	1.17×10^{-5}
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		9.10×10^{-7}
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		7.65×10^{-8}
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		4.20×10^{-8}
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		3.93×10^{-8}
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		2.60×10^{-8}

4.1.4 Composizione del terreno F/2, espressa in Molarità.

Questo terreno, a differenza del precedente, prevede inoltre, l'aggiunta delle vitamine B1, B12 e H al terreno di coltura, in quanto è noto che molte microalghe necessitano di questi importanti cofattori per la crescita.

Le concentrazioni delle vitamine sopracitate sono riportate nella tabella 4.1.5, di seguito riportata.

Vitamine in soluzione madre Concentrazioni [M]	
	[M]
Tiammina * HCl (vitamina B1)	2.96×10^{-7}
Biotina (vitamina H)	2.05×10^{-9}
Cyanocobalammina (vitamina B12)	3.69×10^{-10}

4.1.5 Composizione delle vitamine del terreno F/2, espressa in Molarità.

La preparazione di ogni litro di soluzione avviene aggiungendo, a 995 ml di acqua di mare filtrata, portata alla salinità prevista e autoclavata, 1 mL da ciascuna delle soluzioni di sali elencati nella tabella precedente e 0,5 mL di vitamine.

Nel complesso, per lo svolgimento dell'intero progetto, sono stati allestiti 120 L di terreno di coltura, ripartiti in: 10L per *Dunaliella salina*, 40L per *Nannochloropsis gaditana* (4 cicli da 10L) e 70L per *Scenedesmus sp.* (7 cicli da 10L).

Oltre alle caratteristiche dei terreni di coltura, i parametri di temperatura e di esposizione alla luce, utilizzati sono fondamentali, poiché importanti fattori nello sviluppo delle microalghe.

Le tre colture sono state messe all'interno di una camera termostata, dove la temperatura mantenuta costante attorno ai $20 \pm 1^\circ \text{C}$, è stata la stessa per tutte le alghe studiate.

L'importanza di questo parametro è data dal fatto che la temperatura è strettamente correlata con l'attività biologica degli organismi. Questi due fattori sono legati tra loro in modo proporzionale, in quanto all'aumentare della temperatura, il tasso di crescita ha un aumento proporzionale, fino al raggiungimento del tasso di crescita massimo e della temperatura ideale. Oltre a questo punto il metabolismo si arresta bruscamente, e il tasso di crescita decresce fino a zero (Marshall et al., 1982).

Per quanto riguarda, invece, le condizioni di esposizione luminosa, le colture di *Scenedesmus sp.* e *Nannochloropsis gaditana*, sono state sottoposte a un'intensità luminosa di $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mentre *Dunaliella salina* è stata sottoposta ad una intensità luminosa di $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Alga	Intensità luminosa	
	$\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Watt $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
<i>Scenedesmus sp.</i> e <i>N. gaditana</i>	120	26,08
<i>Dunaliella salina</i>	200	43,48

4.1.6 Tabella relativa all'intensità luminose in $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ utilizzate negli esperimenti di laboratorio e rispettive conversioni in Watt $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

La stima della crescita è stata ottenuta per mezzo dell'analisi delle misure di torbidità, ottenute attraverso la spettrofotometria.

La turbidimetria, o misura di torbidità, è una metodica di tipo ottico che permette di determinare il livello di torbidità di un liquido attraverso la quantificazione dell'attenuazione di un raggio luminoso. Questo valore viene ottenuto confrontando la risposta ottenuta facendo passare il raggio luminoso attraverso il campione con quella rilevata utilizzando il solo terreno di coltura.

Nel nostro studio, condotto con uno spettrofotometro (JAS.CO 7800), è stata utilizzata la lunghezza d'onda di 750 nm, poiché questa lunghezza d'onda non viene assorbita dalle clorofille ed è quindi indicatrice solo della torbidità della

soluzione. Queste misure di torbidità sono state effettuate ad intervalli regolari, mediamente 2-3 giorni, ed hanno permesso di delineare l'andamento della crescita che viene rappresentata in un grafico in cui si mette in relazione l'andamento in biomassa con i giorni.

I valori ottenuti attraverso l'assorbanza è possibile calcolare la capacità di divisione e il tasso di crescita, espressi dalle equazioni riportate nella figura 4.1.7 (Wood A.M., 2005), dove k rappresenta il numero di divisioni al giorno e μ il tasso di crescita della tre diverse specie.

I parametri presi in esame sono $N_{1,2}$ e $t_{1,2}$ che rappresentano rispettivamente i conteggi cellulari o l'assorbanza misurata in ciascun giorno e il tempo di crescita espresso in giorni.

La prima equazione esprime, attraverso il logaritmo del rapporto tra il differenziale della crescita e il differenziale del tempo, la capacità di divisione cellulare. Mentre la seconda equazione esprime il tasso di crescita.

$$k = \frac{\log(N_2 / N_1)}{t_2 - t_1} * 3,322$$

$$\mu = \frac{\ln(N_2 / N_1)}{t_2 - t_1}$$

4.1.7 – Equazioni relative alla velocità di crescita

(N = numero di cellule, μ = velocità di crescita e t = tempo).

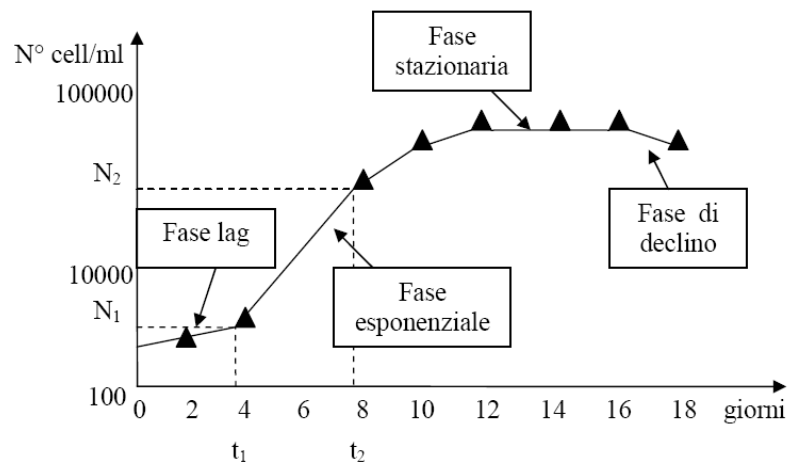
Le misure, effettuate per definire le curve di crescita, a partire dal giorno zero, sono state effettuate ogni 2-4 giorni. Nei giorni di misurazione, 3 ml di coltura,

sono stati prelevati da una beuta di coltura e sono stati letti allo spettrofotometro, in diluizioni 1:1, 1:2 e 1:4, al fine di stimare la crescita delle alghe.

Inizialmente è stata fatta una misura comparativa della torbidità e del numero di cellule in coltura, mentre durante la crescita, lo sviluppo della biomassa e la sua abbondanza sono state valutate esclusivamente per mezzo della torbidità.

Le curve così ottenute hanno messo in evidenza la presenza di due distinte fasi, quella esponenziale e quella stazionaria.

La prima è la fase di rapido accrescimento della biomassa, mentre la seconda fase, quella stazionaria, è una fase di invecchiamento in cui si verifica la riduzione del tasso di crescita, poiché è stato raggiunto l'apice di produttività della biomassa.



4.1.8 Grafico esemplificativo delle fasi di crescita esponenziale e stazionaria, presenti in una curva di crescita tipica.

4.2 – La raccolta.

La fase di raccolta è la fase necessaria per passare dal processo produttivo a quello di trasformazione dell'alga, tuttavia è una fase complessa in quanto specifica e caratteristica per ogni tipo di alga, poiché dipendente dai diversi aspetti morfologici. Infatti la dimensione, la forma, la presenza o meno di parete cellulare, la rigidità o meno di quest'ultima e altri fattori, incidono fortemente sulla scelta della tecnica da utilizzare.

Le tecniche di raccolta principalmente utilizzate in laboratorio sono la filtrazione e la centrifugazione, anche se ne esistono altre come la precipitazione gravimetrica e la raccolta del sedimentato o simili.

Nel caso di *N. gaditana*, la filtrazione è stata scartata per la mancanza di una parete cellulare rigida, fatto che determina il passaggio di una quota rilevante di cellule attraverso il filtro.

Nel nostro caso la filtrazione e la centrifugazione, sono state combinate in successione per ottenere una raccolta efficace sia di *Scenedesmus sp.* che di *D. salina*, mentre per *N. gaditana*, non è stata effettuata per i motivi spiegati sopra.

La filtrazione è stata condotta con filtri in fibra di vetro GF/F e GF/C, (vedi figura 4.2.1) rispettivamente di porosità nominale di 0,8 e 1,2 μm . Questi sono stati utilizzati in un apparato di filtrazione aspirato con il quale si è proceduto alla concentrazione della massa algale in una ridotta matrice acquosa, passando così dagli oltre dieci litri della coltura iniziale, ai 400-500 ml della soluzione concentrata.



4.2.I filtri in fibra di vetro Whatman® GF/F e GF/C, utilizzati.

Porosità nominale di 0,8 e 1,2 μm .

La soluzione concentrata così ottenuta è stata poi posta in bottiglie da centrifuga con fondo conico, da 250ml, ed è stata centrifugata (Beckman J2-HS), per 20 minuti.

Per quanto riguarda la velocità, *Scenedesmus sp.*, che è la più resistente delle tre è stata portata sino a 7500 rpm, corrispondenti a 10400 x g, mentre *Nannochloropsis g.* e *Dunaliella s.*, che sono quelle più delicate, sono state portate a velocità mai superiori ai 4500 rpm, corrispondente a 3740 x g.

Il pellet è stato poi risospeso in una piccola quantità di terreno ed è stato trasferito in provette piccole per essere nuovamente centrifugato. Alla velocità di 3000 rpm (635 x g), con centrifuga ALC 4235-A , per 10 minuti.

Il soprannatante è stato, quindi, eliminato e le provette contenenti il pellet sono state poste in frigorifero a -20° C.

Infine i campioni sono stati liofilizzati per evitare di danneggiare le molecole organiche con procedimenti di essiccazione termica.

Il processo si basa sulla sublimazione dell'acqua contenuta nelle cellule e di quella interstiziale e prevede che le alghe, vengano poste nel liofilizzatore (raffreddato a -50° C), in media, per 24-48 h, fino alla totale sublimazione del ghiaccio presente all'interno del campione.

4.3 – Estrazioni e analisi dei lipidi.

La fase di estrazione della frazione lipidica dai diversi campioni algali è stata fatta utilizzando due procedure note, che sono state adattate, nello specifico, alla matrice algale.

Il primo metodo, che abbiamo chiamato procedura a freddo, consiste in un'estrazione a temperatura ambiente mediante sonicazione, ripetuta tre volte, del campione algale per mezzo di una miscela di cloroformio/metanolo, in proporzione 2:1, per un tempo di 60 minuti.

Il secondo metodo, chiamato procedura a caldo, prevede invece un'estrazione sequenziale del campione alla temperatura di ebollizione, prima con esano e poi con una miscela di cloroformio/metanolo, in proporzione 2:1.

Lo scopo di questo secondo metodo è quello di dividere i lipidi del campione in due frazioni, la prima formata da idrocarburi a corta catena, la seconda formata da lipidi più polari.

Estrazione a freddo.

Il primo metodo utilizzato è stato il metodo estrattivo di Folch (Bligh E. & Dyer, 1959) che nelle fasi preliminari dello studio è stato testato su diverse biomasse microalgali.

Circa 100 mg di campione liofilizzato vengono introdotti in una provetta a fondo conico da 10 ml per essere estratti con 6 mL di una miscela 2:1 di CHCl_3 -MeOH. Tramite sonicazione a bagno d'acqua (Elmasonic 70), della durata di 10 minuti, e una successiva agitazione della provetta per un tempo di 60 minuti.

Terminata la fase estrattiva la soluzione organica viene separata dalla biomassa tramite centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti.

La soluzione organica viene separata dalla biomassa e il solvente viene eliminato per evaporazione, mentre la procedura estrattiva viene ripetuta sul residuo solido, nelle stesse condizioni e secondo gli stessi tempi, per tre volte.

Gli estratti lipidici ottenuti mediante le tre estrazioni sono poi stati uniti per mezzo di lavaggi in esano, al fine di determinare i lipidi totali estratti (per pesata) e la successiva analisi degli acidi grassi, attraverso transesterificazione e analisi GC-FID.

Estrazione a caldo.

Con questo metodo un'aliquota di 2 g di alga liofilizzata, pesata esattamente, viene estratta con 40 mL di esano (in proporzione 1:20 biomassa/solvente) a riflusso per un tempo di 4 ore.

Al termine del riflusso, la soluzione esanica viene separata dalla biomassa per mezzo di una filtrazione su filtro di carta. La soluzione viene concentrata tramite rotavapor e seccata sotto flusso di azoto e il residuo rimasto pesato (lipidi estratti). La biomassa separata dalla soluzione esanica, durante la procedura di filtrazione, viene messa in un pallone per essere riestratta a riflusso per 4 ore con una miscela di cloroformio/metanolo (CHCl_3 -MeOH 2:1 e rapporto 20:1 miscela/campione). La soluzione viene nuovamente seccata, come descritto sopra, e i lipidi determinati per pesata.

Per tutte le alghe le estrazioni sono state condotte almeno in duplicato. Le diverse frazioni lipidiche ottenute sono state conservate in frigorifero a una temperatura di 4° C per le successive analisi GC-MS e GC-FID.

In entrambe le procedure, per permettere la quantificazione dei vari composti attraverso le analisi GC-MS e GC-FID, sono stati aggiunti alle soluzioni di partenza due standard interni, 0,1 μL di acido Nonandecanoico metil estere (conc. 1 mg/mL) e 0,1 μL di Acido Tridecanoico metil estere (conc. 1 mg/mL).

L'uso di questi standard ha permesso di valutare le quantità dei diversi acidi grassi valutando il segnale specifico dell'acido palmitico, l'acido oleico e l'acido arachidonico, iniettando tre diverse soluzioni a quantità note (1000 ppm), in esano.



4.3 - 1 Soluzioni organiche estratte a freddo (procedura di Folch) in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ dai tre campioni algali.

Nell'ordine *Nannochloropsis gaditana*, *Scenedesmus sp.* e *Dunaliella salina*.

Solventi e reattivi utilizzati.

Cloroformio (CHCl_3) – ACN, Sigma-Aldrich, purezza 99,9%.

Metanolo (CH_3OH) - ACN, Sigma-Aldrich, purezza 99,8%.

n-Esano (C_6H_{14}) – J.T. Baker, purezza 95%.

Sodio Solfato Anidro (Na_2SO_4) – Riedel-de Haen, purezza 99%.

Determinazione dei lipidi totali.

La determinazione dei lipidi totali è ottenuta per pesata, dopo che tutto il solvente di estrazione è stato evaporato a secchezza.

Nel caso di *D. salina* la soluzione organica conteneva dei sali per cui è stata lavata con acqua deionizzata prima di procedere alla pesata.

Transesterificazione degli Acidi Grassi.

La procedura di transesterificazione utilizzata è la procedura ufficiale AOAC-IUPAC Metanolo- Boro Trifluoruro (MeOH-BF₃) (Williams S. et al., 1984) sui lipidi estratti a caldo con esano e CHCl₃-MeOH (sulle due frazioni unite).

Ad un'aliquota di estratto lipidico (~15 mg) è aggiunto 1 mL di idrossido di sodio in metanolo (0,5 M). Il campione così preparato viene poi messo a riflusso per 15 minuti.

Successivamente vengono aggiunti 2 ml di MeOH-BF₃ (~10%), e il campione viene nuovamente messo a riflusso per 10 minuti.

Dopo aver raffreddato la soluzione questa viene travasata in un imbuto separatore, riprendendo con esano (1,5 mL x 2) e lavando con una soluzione di acqua satura di NaCl (3 mL x 2).

La frazione organica, una volta separata, viene seccata utilizzando sodio solfato anidro e successivamente il solvente viene concentrato sotto flusso di azoto per dare un campione analizzabile con i metodi GC/MS e GC/FID.

Analisi GC/MS e GC/FID.

L'identificazione degli acidi grassi è stata effettuata tramite analisi GC-MS (Gas Cromatografo interfacciato a Spettrometro di Massa), l'analisi quantitativa è stata effettuata tramite GC-FID (Gas Cromatografia associata al rilevatore a ionizzazione di fiamma).

Le analisi GC-MS sono state condotte con un GC Agilent 6850 interfacciato a un MS Agilent 5975, usando He come fase mobile e flusso 1 ml/min. La separazione è avvenuta in una colonna (colonna capillare, model n° Agilent 19091S-433E, HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane, t max 325° C, lunghezza nominale 30.0 m, diametro nominale 250.00 um, spessore nominale film 0.25 um. Flusso iniziale 1.0 mL/min, press. Nominale 7.65 psi.)

La programmata termica utilizzata prevede:

T iniziale dell'iniettore di 50° C, T finale di 310° C, rampa da 50° C a 220° C con un escursione di 20° C/ min. Raggiunti i 310° C permane a temperatura per 5 min. ed usa un Post time di 2 min. alla T di 310° C. L'analisi prevede un tempo di esecuzione di 21,40 min. Gli spettri di massa sono stati ottenuti con uno ionizzatore elettronico EI a 70 eV.

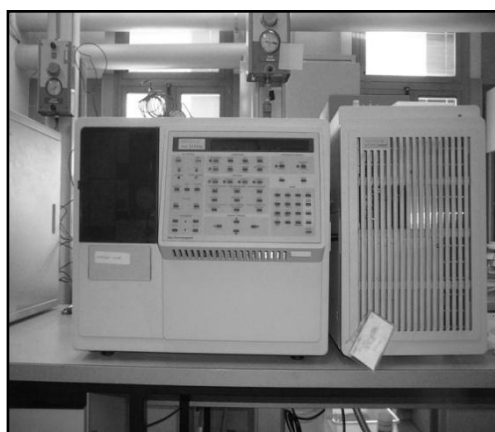
Le analisi GC-FID sono state condotte con un Varian STAR 3400, su cui è montata una colonna dello stesso tipo di quella montata sul GC-MS, per il quale è stato impostato un metodo che prevede:

T iniziale dell'iniettore di 50° C, T 1 220° C, con rampa di 20° C/ min. Raggiunti i 220° C la rampa cambia passando a 5° C/min. fino a T fin. 310° C. A T fin. la temperatura viene mantenuta per 10 min. L'analisi prevede un tempo di esecuzione totale di 30,40 min. La temperatura del detector, il FID, é di 280° C.

4.4 – Pirolisi analitica Py-GC/MS.

Pirolisi on-line.

Le pirolisi sono state condotte con un sistema Py-GC/MS costituito da una sonda a filamento di platino riscaldato pyroprobe 2000 (CDS Analytical) interfacciata ad un GC Varian STAR 3400 CX a sua volta interfacciato ad una trappola ionica Varian Satin 2000.



4.4.1 A sinistra, il corpo del pirolizzatore e la sonda (CDS Pyroprobe 1000) mentre di sopra, si vede il GC/MS (Varian STAR 3400 CX) utilizzati per le analisi (Laboratorio Chim. Anal. CIRSA).

Le pirolisi sono state eseguite a 700° C per 5 minuti su 1-2 mg di campione algale (biomassa totale) o di filtro (per le prove di crescita).

L'interfaccia utilizzato, l'iniettore 1077, è stato preriscaldato alla temperatura di 280° C, la colonna capillare Supelco MDN-5S, caratterizzata da fase stazionaria composta al 5% in fenile e al 95 % in metile (polisilossano, lunghezza nominale 30.0 m, diametro nominale 0,25 mm, spessore nominale film 0.25 µm).

I prodotti separati per mezzo del GC sono poi stati analizzati attraverso l'MS in ionizzazione elettronica (70 eV) con una scansione al secondo nell'intervallo di massa compreso fra 45-500 m/z.

L'identificazione degli spettri di massa è stata effettuata confrontando gli spettri ottenuti con quelli contenuti nella libreria NIST 92. Completato il riconoscimento, la quantificazione è stata effettuata integrando le aree dei picchi, ottenuti selezionando gli ioni specifici di ciascuna sostanza. Infine, per esprimere la percentuale relativa di ciascuna sostanza, sono state calcolate le percentuali relative, relazionando l'area di ciascuna sostanza alla somma totale delle aree e la relativa. Dall'analisi di più campioni è stata calcolata la composizione percentuale media e la relativa deviazione standard associata.

Pirolisi da banco.

Le pirolisi sono state condotte sul liofilizzato delle coltivazioni di *Scenedesmus* sp., sia originale che sul residuo proveniente dall'estrazione a riflusso con CHCl₃/MeOH, alla temperatura di 500 °C per un tempo di 5 minuti, secondo le modalità descritte in letteratura (Fabbri D., 2007).

La configurazione utilizzata per il reattore a letto fisso è simile, per la parte preparativa, a quella descritta da Cozzani et al., 2006. E' composto da un reattore tubolare di quarzo (lunghezza 650 mm, diametro interno 37 mm) posto coassialmente all'interno di una fornace refrattaria (Carbolite, Italy), la quale è dotata di una termocoppia e di un iniettore di azoto, presenti come valvola a pressione e misuratore di flusso.

In sequenza, la struttura di quarzo continua con una trappola fredda, a ghiaccio, dove condensa l'olio di pirolisi e successivamente un imbuto separatore per intrappolare i composti condensabili (Fig. 1).

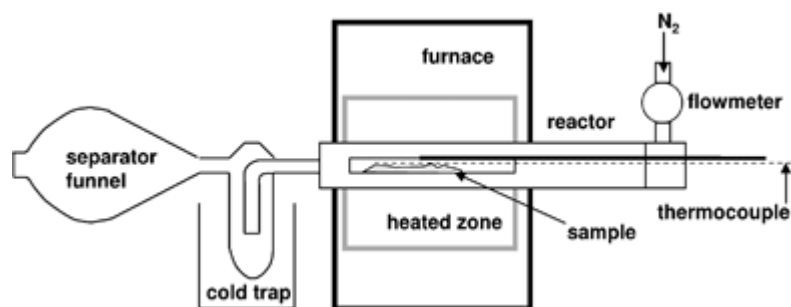


Fig. 1 Schema esemplificativo del reattore di pirolisi da banco utilizzato.

Il campione analizzato (circa 1 g di biomassa algale) è stato messo sul porta-campione estraibile (in quarzo) del reattore, in modo uniforme, il flusso di azoto è stato impostato a $1500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ e il forno è stato acceso.

Non appena la temperatura del forno ha raggiunto il valore stabilito, il campione è stato posizionato nella parte centrale, riscaldata, per 5 minuti ed in seguito spostato nella parte fredda del reattore.

Il bio-olio recuperato nella trappola a freddo e nell'imbuto separatore è stata pesato e recuperato in due lavaggi, prima con esano per separare la parte meno polare e poi con acetone, per recuperare tutto il bio-olio restante.

Due aliquote, prelevate delle due soluzioni, sono poi state diluite e analizzate attraverso GC/MS.

4.5 – Metodi di determinazione.

Determinazione delle proteine.

Il metodo di Lowry (Lowry OH et al., 1951) è basato sulla reazione colorimetrica data dal reattivo di Folin (fosfomolibdato, fosfotungstato, sali rameici) con gli amminoacidi che contengono anelli aromatici. La determinazione quantitativa viene effettuata attraverso la lettura dell'assorbanza con lo spettrofotometro a 750 nm, facendo riferimento ad una curva di taratura costituita utilizzando quantità note di albumina bovina come standard.

Il metodo prevede la preparazione di una serie di soluzioni base:

soluzione 1: 5 g di Na_2CO_3 a 50 mL di NaOH 0,1M;

soluzione 2: 0,5 g di Na,K tartrato a 50 mL di H_2O ;

soluzione 3: 50 mg di CuSO_4 disciolti in 10 mL della soluzione 2.

Da queste si ricavano le soluzioni A e B, dove:

- la soluzione A è composta da 10 mL della soluzione 1 a cui è aggiunto 1 mL della soluzione 3;
- la soluzione B è composta da 3 mL Folin Ciocalteu a cui sono aggiunti 27 mL di H_2O .

Il metodo prevede l'estrazione delle proteine totali, attraverso la centrifugazione di 10 mL di coltura (a 13000 rpm per 10 min.) seguita dall'eliminazione del soprannatante e alla risospensione del pellet ottenuto, attraverso l'aggiunta di 1 mL di NaOH 0,1M.

Al campione risospeso, viene aggiunto 1 mL di soluzione A e successivamente viene agitato attraverso vortex e incubato per 10 min..

Infine vengono aggiunti, alla soluzione, 3 mL della soluzione B. Nuovamente agitata attraverso il vortex e incubato per un tempo di 30 min..

La lettura spettrofotometrica, effettuata a 750 nm, permette attraverso la curva di taratura effettuata con gli standard di BSA (μg BSA 0,20,40,60,80,100,150), di determinare i μg di proteine presenti in ciascun campione analizzato.

Infine per ottenere il valore di proteine totali, occorre moltiplicare il valore per un fattore di correzione capace che tenga conto di tutte le diluizioni effettuate.

Determinazione dei polisaccaridi.

I metodi utilizzati per l'estrazione e la determinazione dei polisaccaridi sono rispettivamente il metodo di Myklestad (Myklestad, S., Haug, A., 1972) e il metodo di Dubois (Dubois, M., 1965).

Il metodo estrattivo di Myklestad prevede che si prelevi un aliquota di campione (5-10 mg), a cui si aggiungono 2 mL di H_2SO_4 all'80% per poi lasciare in incubazione la soluzione per 20 ore a 20°C. Infine, si prepara il campione per la determinazione di Dubois, diluendo il campione con 6 mL di H_2O distillata.

I polisaccaridi, così estratti, si determinano attraverso il metodo di Debois (Dubois, M., 1965). Questo metodo prevede una reazione di colorazione della soluzione, causata da una reazione tra i gruppi fenolici e i furfurali. Questi ultimi sono la forma condensata assunta dagli zuccheri in presenza di alte concentrazioni di acidi.

Si prelevano 1 mL di soluzione, dalla soluzione contenente i polisaccaridi estratti, e uniscono a 1 mL di acqua distillata.

A questa nuova soluzione si aggiungono 50 μL di fenolo (80%) e 5 mL di H_2SO_4 concentrato, la soluzione così ottenuta viene poi agitata e fatta riposare per 30 min..

Al termine si effettuano le letture allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 485 nm. e si confrontano i risultati con la curva di taratura basata sulle concentrazioni di glucosio di 20,40,60,80,100 e 150 μg .

Determinazione delle ceneri.

Le ceneri delle biomasse algali sono state determinate partendo da un campione di biomassa algale di 100 mg, pesato in maniera precisa, questo è stato messo all'interno di un crogiuolo pretrattato, all'interno della muffola, ad una temperatura di 500°C per un tempo di 4 ore.

Così, attraverso la pesata, è stato possibile determinare il peso percentuale delle ceneri rispetto al peso totale.

Determinazione dell'umidità nei liofilizzati.

Il metodo Karl Fischer (Fischer K. et al., 1935; Scholz, E. et al., 1983) è stato utilizzato per determinare l'umidità presente nei campioni algali liofilizzati, si basa su una titolazione volumetrica in grado di rilevare le tracce di acqua a partire dalle 100 ppm.

La titolazione è condotta per via amperometrica ed assicura un'alta precisione. Il dato fornito dallo strumento è espresso in mg di H₂O presenti nel campione analizzato, che nel nostro caso era di 20 µg.

Determinazione Analisi Elementare.

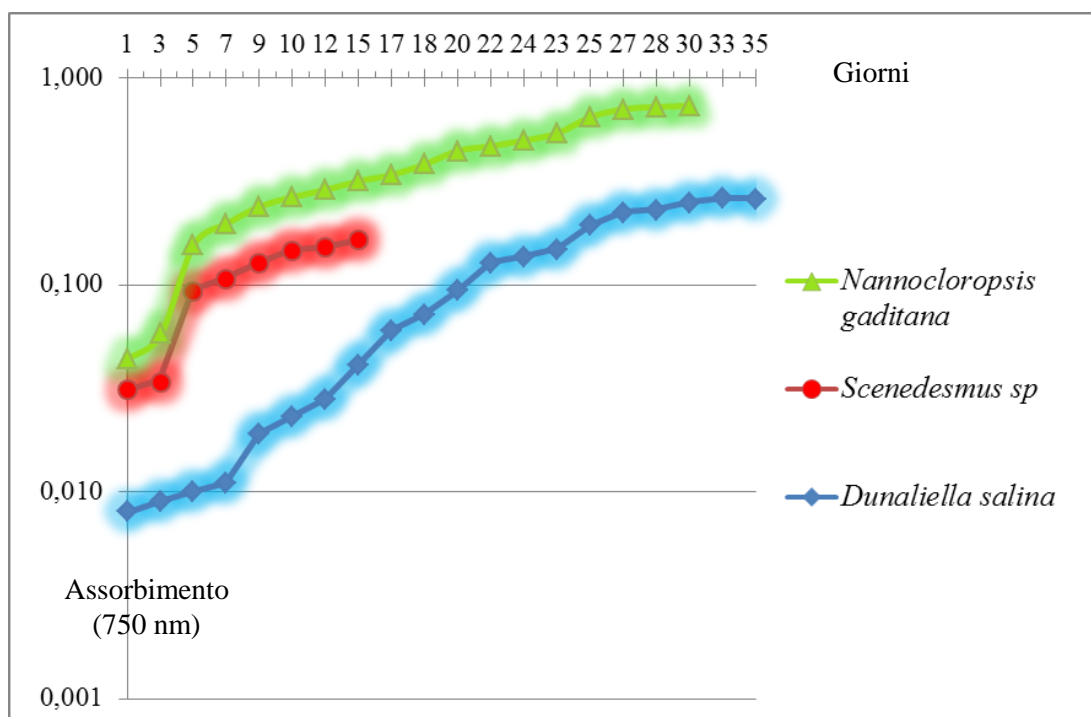
L'analisi elementare (EA o analisi CHNS) è la determinazione della percentuale in peso di carbonio, idrogeno, azoto e zolfo presente in un campione.

L'analisi composizionale della biomassa è stata condotta utilizzando un analizzatore elementare (THERMO Scientific, "FLASH 2000" Organic Elemental Analyzer CHNS-O) che utilizza la tecnica della combustione "flash".

Capitolo 5 – Risultati.

5.1 – Curve di crescita.

La crescita delle tre specie algali, *Dunaliella salina*, *Scenedesmus sp.* e *Nannochloropsis gaditana*, è stata stimata grossolanamente attraverso misurazioni della torbidità e alla fine della crescita tramite conteggio della cellule. La figura 5.1.1 mostra l'andamento delle torbidità in relazione al passare del tempo, mettendo in evidenza le due fasi tipiche della crescita delle alghe, la fase esponenziale e quella stazionaria. Queste due fasi si distinguono bene nei grafici in quanto la fase esponenziale consiste in una rapida crescita dovuta alla replicazione cellulare, mentre, la fase stazionaria, è costituita dalla parte terminale dei grafici che tende ad una forma a “plateau”. Sono riportati, in un unico grafico riassuntivo (grafico 5.1.1), le curve di crescita delle tre alghe utilizzate a confronto fra loro.



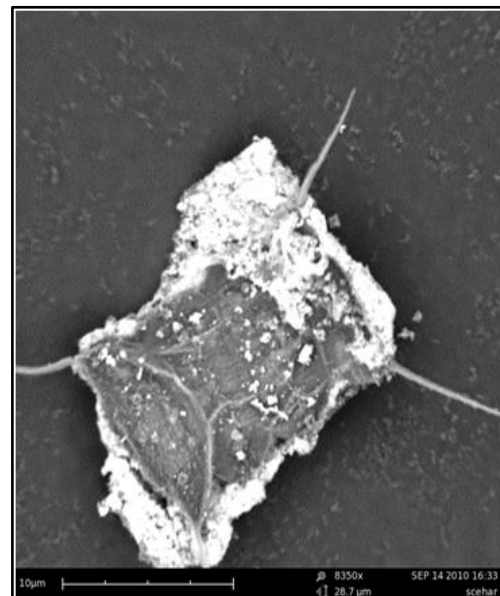
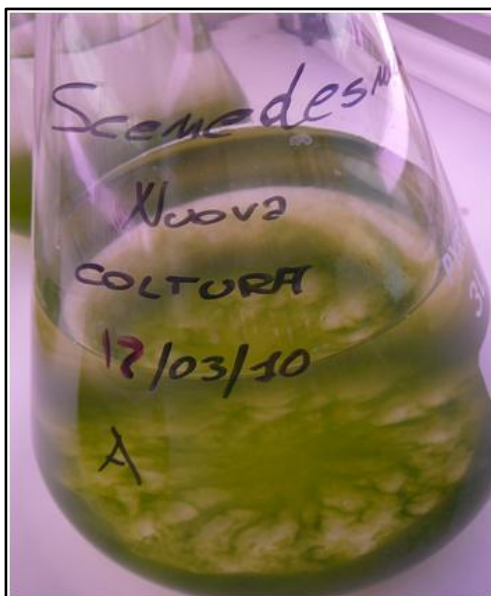
5.1.1 – Confronto delle tre curve di crescita, riportante sull'asse delle ascisse, il tempo espresso in giorni, e sull'asse delle ordinate, la torbidità riportate come scala logaritmica dei valori di assorbanza a 750 nm.

Le tre curve hanno così evidenziato tassi di crescita e tempi di crescita diversi, permettendo così di notare che, mentre *Scenedesmus sp.* raggiunge il suo plateau in circa 2 settimane, *Nannochloropsis gaditana* e *Dunaliella salina* hanno bisogno rispettivamente di un periodo di quattro e di cinque settimane.

Tuttavia, questo grafico ci suggerisce un ulteriore dato, ovvero che, mentre *Scenedesmus sp.* e *Dunaliella salina* arrivano alla massima crescita con valori di torbidità attorno a 0,260-0,280, *Nannochloropsis gaditana* arriva al plateau con valori attorno a 0,490. Questo fa pensare ad un valore di concentrazione cellulare maggiore per *N. gaditana* rispetto a *Scenedesmus sp.* e *D. salina*.

Le concentrazioni cellulari medie, che sono state misurate alla fine della crescita, sono 15.154.896 cell/ml per *N. gaditana*, 2.387.028 cell/ml per *Scenedesmus sp.* e 502.274 cell/ml per e *D. salina*.

Questo dato tuttavia non è direttamente correlato alla produzione di biomassa che risulterà maggiore per *Scenedesmus sp.*, seguita da *N. gaditana* e infine da *D. salina*.



5.1.2 - Singola cellula dell'alga verde *Scenedesmus sp* delle nostre colture (a sinistra),
coltura da 1,6 litri di *Scenedesmus sp* a (destra).

La caratteristica di *N. gaditana* di avere alti valori di torbidità ci spingerebbe a considerare l'alga, anche se caratterizzata da una crescita più lenta di *Scenedesmus*, capace di raggiungere concentrazioni maggiori. Tuttavia il confronto tra i valori di assorbanza, le concentrazioni cellulari e i valori di biomassa, ha messo in evidenza come l'assorbanza sia legata più alle caratteristiche della biomassa che non alle quantità di biomassa prodotta.

Infatti, anche se i valori di assorbanza erano notevolmente diversi fra loro, ovvero 0,238-0,385-0,543 per *D. salina*, *Scenedesmus sp.* e *N. gaditana*, i valori di biomassa valutati come peso secco, raggiunti da ciascuna alga, si sono dimostrati essere piuttosto simili, essendo tutte comprese tra 140 mg/L e 130 mg/L.

Questi valori non devono essere considerati i massimi possibili in quanto in letteratura (Dwi Susilaningsih et al., 2009) è riportato che i valori di concentrazione e i tempi di crescita migliorano, aumentando i primi e diminuendo i secondi, nel caso venga addizionata CO₂ al terreno di coltura, per mezzo di un gorgogliatore, cosa che in questo studio non è stata applicata.

Nella tabella 5.1.3 sono riportati i valori di divisione cellulare (k), il tasso di crescita (μ) e i relativi tempi di duplicazione (t_d) delle tre specie in esame, utili per valutare se poter impostare un ciclo di produzione continua delle stesse, in un'ottica di produzione di biocombustibili.

Dai dati si vede che *Dunaliella salina* è quella caratterizzata dal maggiore tempo di duplicazione, pari a 4,64 giorni, seguita da *Nannochloropsis gaditana* e *Scenedesmus sp.* caratterizzati rispettivamente da tempi di 1,44 e 1,16 giorni.

	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>
Divisioni al giorno (k)	0,22	0,87	0,70
Tasso di crescita (μ)	0,15	0,60	0,48
Tempo di duplicazione (t_d)	4,64	1,16	1,44

5.1.3 Tabella riportante i valori di divisione cellulare (k è espresso in div./g), il tasso di crescita (μ espresso in g⁻¹) e il tempo di duplicazione (t_d espresso in giorni).

5.2 – Pirolisi analitica (Py-GC/MS).

Py-GC/MS dei filtri raccolti durante la crescita.

Al fine di analizzare la variazione della composizione delle microalghe, durante la crescita, sono stati raccolti ad intervalli regolari le biomasse contenute in 100 ml di terreno delle colture algali, su filtri di fibra di vetro. Questi filtri sono stati sottoposti ad analisi tramite la Py-GCMS, la pirolisi in associazione alla gas cromatografia, per la separazione, e alla spettrometria di massa, per il riconoscimento dei prodotti di pirolisi.

5.2.1 – Tabella dei marker del pirolizzato associati a famiglie di composti.

(T.r. – tempo di ritenzione; m/z degli ioni usati per l'identificazione del picco GC;

P – proteine; C – carboidrati; CHL – clorofille; L – lipidi).

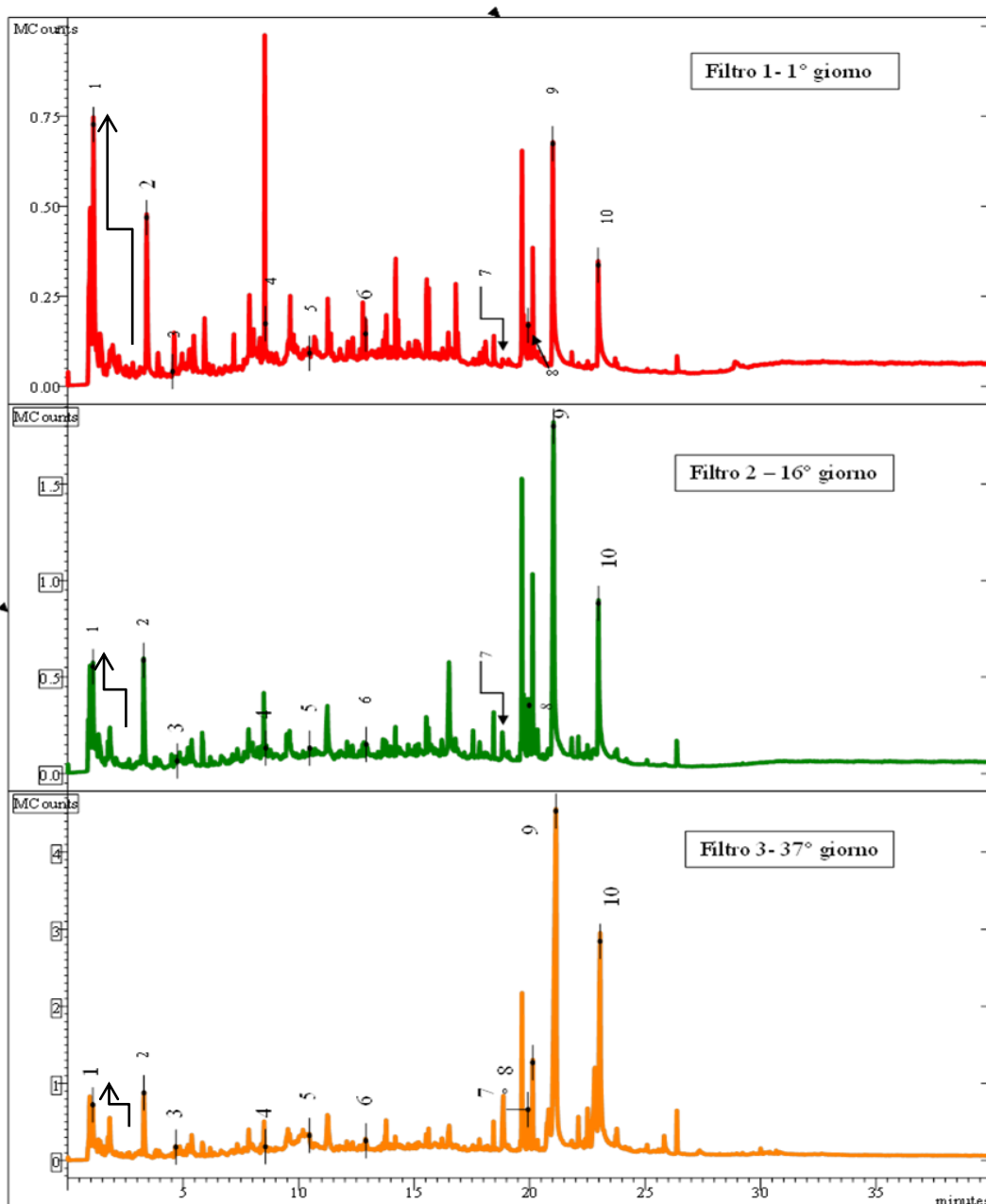
N°	Prodotti di PIROLISI	t.r. min.	Ione m/z	Origine
1	Pirrolo	2,9	67	P
2	Toluene	3,1	91	P
3	Furaldeide	2,2	95	C
4	2-idrossi-3-metil ciclopentano	8,6	112	C
5	Benzene acetonitrile	10,6	90	P
6	Indolo	13,1	117	P
7	Fitadiene	19,8	278	CHL
8	Fitadiene	20,3	278	CHL
9	Acido palmitico	21,3	256	L
10	Acido stearico	23,2	284	L

L'obiettivo principale di questo studio è quello di capire le variazioni dei tre principali componenti dell'alga, lipidi, proteine e carboidrati.

La figura 5.2.2 mostra i pirogrammi ottenuti nelle analisi Py-GCMS dei filtri delle colture di *Dunaliella salina* raccolte in tre momenti della crescita. Per determinare l'entità di ognuna delle tre frazioni, sono stati scelti prodotti di pirolisi tipici di ciascun gruppo, proteine, lipidi e carboidrati.

Come marker delle proteine (P) sono stati scelti il pirrolo, il toluene, il benzene acetonitrile e l'indolo, prodotti di pirolisi di amminoacidi quali fenilalanina, prolina e triptofano. Per la categoria dei carboidrati (C) sono state scelte la furaldeide e il 2-idrossi-3-metil ciclopentanone, poiché tipici composti derivanti dalla degradazione degli zuccheri. Infine, per la categoria dei lipidi (L), i marker scelti sono stati l'acido palmitico (16:0) e l'acido stearico (18:0), provenienti dalla degradazione termica degli acilgliceroli, e i fitadieni, prodotti dalla decomposizione del fitolo presente nelle clorofille (CHL).

L'elenco dei prodotti di pirolisi utilizzati come marker è riportato nella tabella 5.2.1, che evidenzia, per ciascun composto il tempo di ritenzione, lo ione m/z di quantificazione e il precursore.



5.2.2 Pirogrammi, relativi a diversi punti di crescita, ottenuti dalla PY-GC/MS dei filtri di *Dunaliella salina*. Notare la diversa scala dell'asse y.

I numeri sui picchi si riferiscono alla tabella 5.2.1.

La figura 5.2.2, mostra come l'intensità dei picchi (asse y) aumenti all'aumentare del periodo di raccolta in accordo con l'aumento della torbidità.

Poiché non è possibile determinare le rese assolute dei prodotti di pirolisi, si stima il loro contributo relativo attraverso il calcolo delle aree percentuali dei picchi GC.

I risultati riportati, per quanto riguarda *D. salina*, in tabella 5.2.3 mostrano un incremento della componente lipidica a fronte di una sensibile diminuzione di quella proteica.

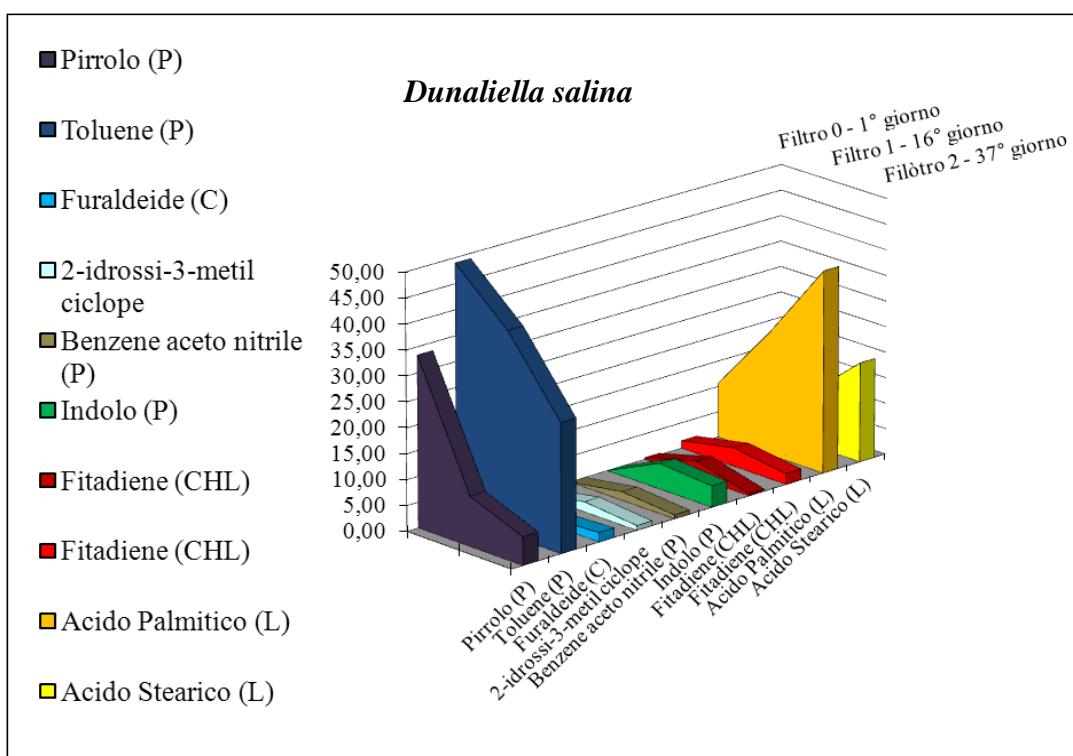
Nello specifico, si osserva come i marker delle proteine, hanno subito nel tempo un'evidente diminuzione, mentre i marker dei lipidi, mostrano un aumento dei valori (grafico 5.2.4).

FILTRI	Filtro 0 - 1° giorno	Filtro 1 - 16° giorno	Filtro 2 - 37° giorno
Pirrolo (P)	33	9,7	5,5
Toluene (P)	48	39	25
Furaldeide (C)	0,5	1,3	1,8
2-idrossi-3-metil ciclopentanone	0	1,9	0,9
Benzene aceto nitrile (P)	0	1,6	0,7
Indolo (P)	0	5	4,1
Fitadiene (CHL)	0,3	3,2	0,4
Fitadiene (CHL)	1,4	3,6	2,1
Acido Palmitico (L)	10	24	39
Acido Stearico (L)	4,6	9,6	19

Tab. 5.2.3 – Py-GC/MS abbondanze relative (% Rel) dei picchi GC per i campioni di *Dunaliella salina*.

L'evoluzione composizionale, espressa in percentuale relativa, è evidenziata nel grafico 5.2.4.

5.2.4 – Evoluzione composizionale di *D. salina* con, in evidenza, le frazioni lipidica, proteica e carboidratica, studiate attraverso i diversi marker.



Nel caso invece di *Scenedesmus sp.* (Tab. 5.2.5) si è vista un'iniziale assenza della frazione lipidica nel liofilizzato, fino al termine della prima settimana, e solo in seguito i valori percentuali sono aumentati attestandosi attorno a valori prossimi al 30 % (grafico 5.2.6).

La componente proteica, invece, ha seguito una graduale diminuzione nel tempo, dall'iniziale 90 % fino a valori compresi tra 40-50 %, a favore della componente carboidratica. Quest'ultima, al termine della crescita, corrisponde a una percentuale relativa pari al 6 %.

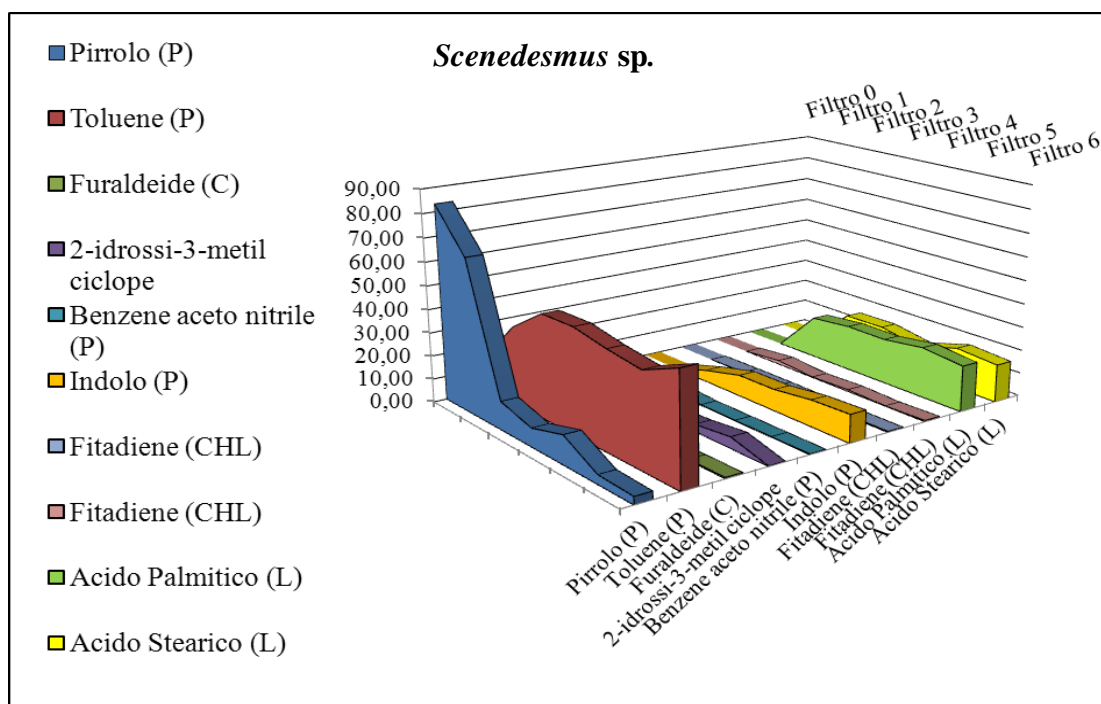
A differenza di ciò che si è visto in precedenza con *Dunaliella*, quest'alga non presenta un incremento continuo della frazione lipidica, ma in realtà sembra produrne relativamente poco nel primo periodo, mentre si assesta a valori pressoché costanti dal giorno sette in poi (circa 35%).

	Giorno 1	Giorno 5	Giorno 7	Giorno 9	Giorno 12	Giorno 14	Giorno 16
Pirrolo (P)	83	31	14	10	5,0	3,8	3,0
Toluene (P)	16	67	38	40	45	39	38
Furaldeide (C)	0	0	0	0	0,7	0,7	1,1
2-idrossi-3-metil ciclopentanone (C)	0	0	1,1	3,2	3,2	4,3	4,8
Benzene acetone nitrile (P)	0	0	1,3	4,2	2,3	2,4	2,2
Indolo (P)	0	0	5,6	6,7	9,1	10	10
Fitadiene (CHL)	0	1	0,3	0,6	0,3	0,3	0,3
Fitadiene (CHL)	0	0	0,1	0,4	0,1	0,1	0,0
Acido Palmitico (L)	0	0	21	20	20	21	21
Acido Stearico (L)	0	0	17	15	13	17	17

Tab.5.2.5 – Py-GC/MS Abbondanze relative (% Rel.) picchi GC per i campioni di *Scenedesmus sp*

Comunque è da tener presente che, a causa del basso contenuto di materiale organico contenuto, la rilevazione dei prodotti di pirolisi è difficile nei filtri raccolti nei primi giorni dello studio di crescita, che quindi spesso presentano quantità inferiori alla soglia di rilevabilità.

5.2.6 - Evoluzione composizionale di *Scenedesmus sp.*, con in evidenza, le frazioni lipidica, proteica e carboidrata, studiate attraverso i singoli marker.

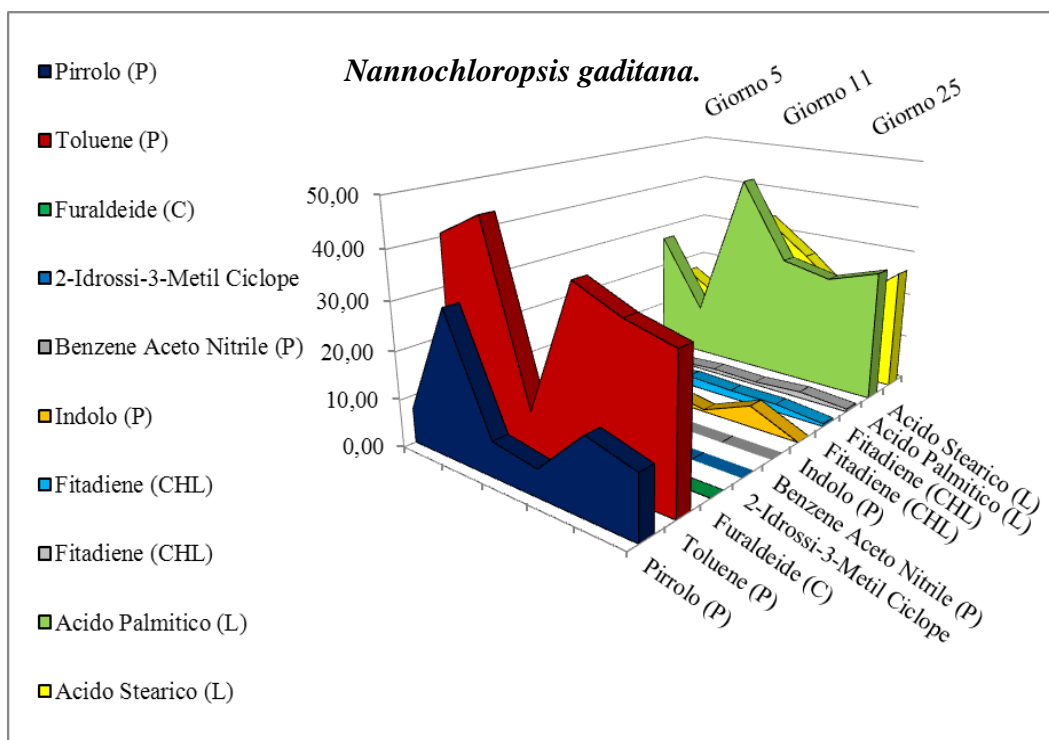


L'analisi dei filtri di *Nannochloropsis gaditana*, riportata in tabella 5.2.7 e illustrata nel grafico 5.2.8, diversamente dalle altre due alghe, ha un andamento non uniforme tra la componente proteica e quella lipidica.

Tab. 5.2.7 – Py-GC/MS Abbondanze relative (% Rel.) picchi GC per i campioni di *N. gaditana*.

	Giorno 5	Giorno 9	Giorno11	Giorno 16	Giorno25	Giorno31
Pirrolo (P)	7,3	30	7,4	5,7	15	13
Toluene (P)	40	45	4,6	37	33	31
Furaldeide (C)	0	0,4	0,5	0,6	0,6	0,3
2-Idrossi-3-Metil Ciclopentanone (C)	1,0	0,2	1,4	2,2	3,0	4,8
Benzene Aceto Nitrile (P)	1,7	1,4	0	0	0	0
Indolo (P)	5,3	0	2,1	0,4	4,6	0
Fitadiene (CHL)	0,2	0,1	2,1	1,7	1,7	0,6
Fitadiene (CHL)	0,1	0,1	0,9	0,6	1,3	0,6
Acido Palmitico (L)	26	11	43	27	25	28
Acido Stearico (L)	16	10	29	26	17	26

5.2.8 - Evoluzione composizionale di *Nannochloropsis gaditana*., con in evidenza, le frazioni lipidica, proteica e carboidratca, studiate attraverso i singoli marker.



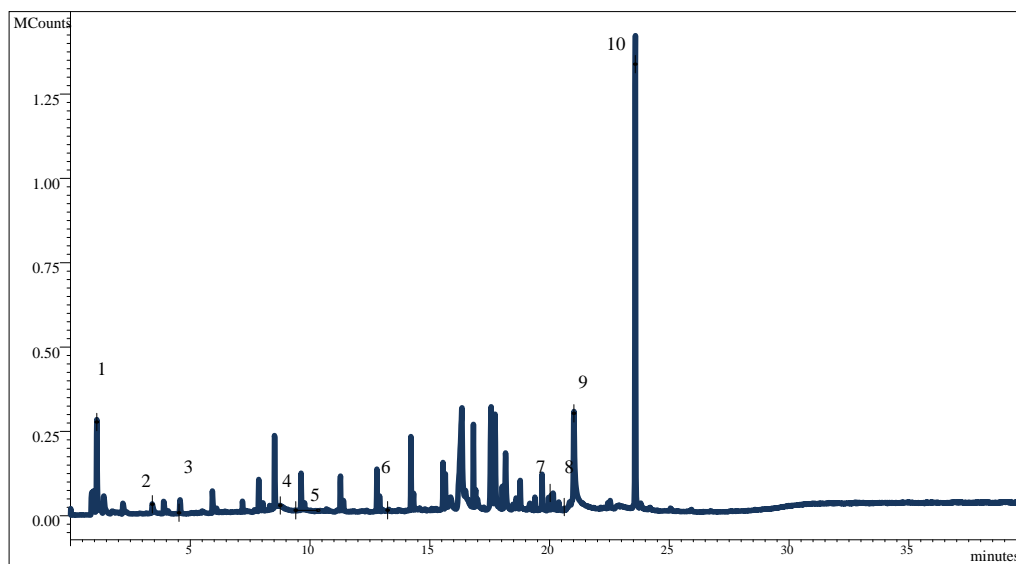
Py-GC/MS della biomassa algale.

I campioni algali di *Dunaliella salina*, *Scenedesmus sp.* e *Nannochloropsis gaditana* sono stati analizzati dopo aver raggiunto, rispettivamente, cinque, due e quattro settimane di crescita della coltura.

Le analisi sono state fatte sul campione liofilizzato di biomassa omogeneizzato, tramite mescolamento delle biomasse provenienti da diverse colture effettuato per ciascuna alga.

Su ciascun campione omogeneizzato sono state effettuate tre repliche.

Dunaliella Salina



5.2.9 – Py-GC/MS di *Dunaliella salina* a crescita ultimata (5 settimane).

I marker evidenziati sono: 1- Pirrolo (P), 2- Toluene (P), 3- Furaldeide (C), 4- 2-idrossi-3-metil ciclopentano (C), 5- Benzene acetonitrile (P), 6- Indolo(P), 7- Fitadiene1 (CHL), 8- Fitadiene2 (CHL),

9- Acido Palmitico (L) e 10- Acido Stearico (L).

Nella figura 5.2.9 è riportato, come esempio, un pirogramma ottenuto dalle Py-GC/MS di *Dunaliella salina*, a crescita ultimata. Su questo sono evidenziati, per mezzo della numerazione già usata in precedenza nelle tabella 5.2.1, i marker

specifici delle proteine (P), dei carboidrati (C), delle clorofille (CHL) e dei lipidi (L).

Nella tabella 5.2.10, sono riportati le percentuali relative, dei diversi marker, riscontrate nelle diverse repliche effettuate per *Dunaliella salina*, *Scenedesmus sp.* e *Nannochloropsis gaditana*.

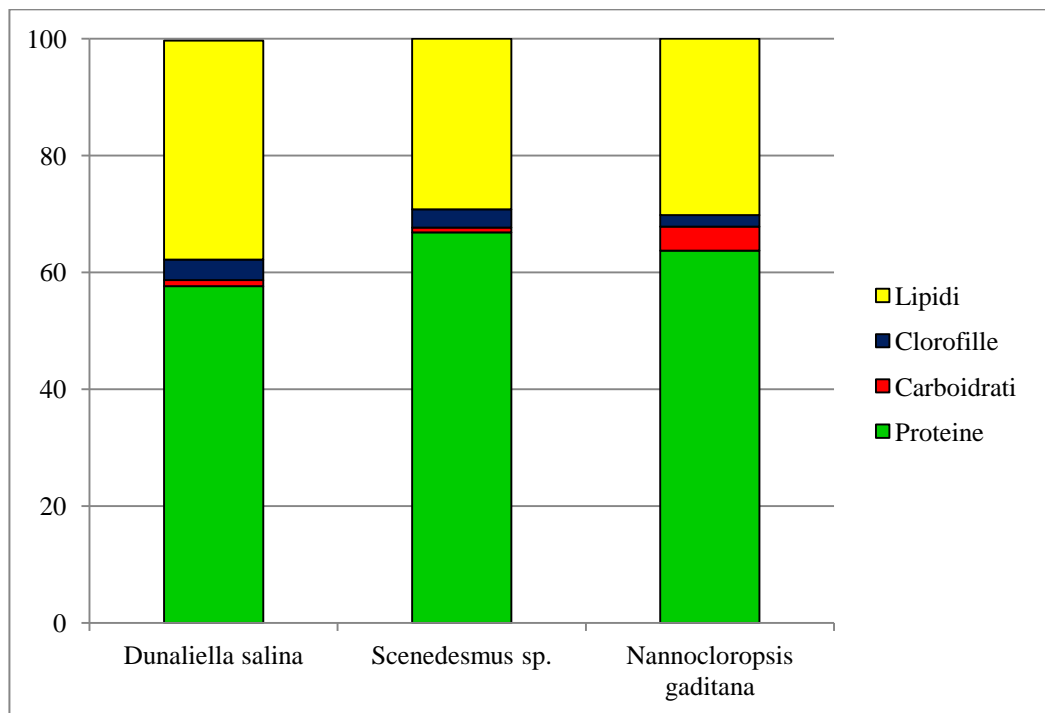
Risultata evidente una significativa variabilità dei valori di abbondanza relativa dei diversi marker nelle tre repliche effettuate, probabilmente a causa dell'elevato contenuto di sali e relativa eterogeneità del campione

	Scenedesmus Sp.		Dunaliella salina		Nannochloropsis gaditana	
	Media	St.Dev.	Media %	St.Dev.	Medie %	St.Dev.
Pirrolo (P)	4,0	0,7	14,0	3,3	6,2	0,8
Toluene (P)	48,0	1,7	39,0	3,6	47,0	0,2
Furaldeide (C)	0,5	0,3	0,7	1,0	0,4	0,2
2-idrossi-3-metil ciclopentanone	0,3	0,4	0,3	0,5	3,8	0,5
Benzene aceto nitrile (P)	2,8	1,7	1,2	0,5	0,2	0,1
Indolo (P)	11,0	0,7	3,2	2,6	10,0	0,6
Fitadiene (CHL)	0,2	0,1	1,4	1,7	0,3	0,1
Fitadiene (CHL)	2,9	1,6	2,1	1,6	1,7	1,0
Acido Palmitico (L)	20,0	0,6	23,0	3,2	17,0	1,1
Acido Stearico (L)	9,1	5,0	11,0	2,7	14,0	0,7

Tab. 5.2.10 –Abbondanze relative dei prodotti di pirolisi ottenute per mezzo di analisi Py-GC/MS dei campioni di *Dunaliella salina*, *Scenedesmus sp.* e *Nannochloropsis gaditana*.

Nella figura 5.2.11 sono messi a confronto, per mezzo di un diagramma a barre, le abbondanze relative sommate fra loro dei marker rappresentati di ciascun precursore: proteine (P), carboidrati (C), clorofille (CHL) e lipidi (L).

Il diagramma mostra che la distribuzione dei prodotti di pirolisi rappresentate dalle quattro componenti è abbastanza simile.



5.2.11 - Diagramma a barre riportante il confronto delle tre alghe in relazione alle abbondanze relative

dei marker rappresentati di ciascun precursore proteine (P), carboidrati (C), clorofille (CHL) e lipidi (L), sommati fra loro. Si evidenzia come la distribuzione dei prodotti di pirolisi sia abbastanza simile.

5.3 – Estrazioni con solvente dei lipidi.

Due diverse metodologie estrattive, sono state scelte e messe a confronto, allo scopo di studiarne le differenti capacità estrattive e le possibili capacità di estrazione selettiva delle componenti lipidiche della biomassa algale (per brevità sono state denominate estrazione a freddo e a caldo).

Estrazione a freddo.

La frazione lipidica, estratta con il metodo a freddo (sonicazione a temperatura ambiente e agitazione con soluzione estraente $\text{CHCl}_3\text{-MeOH 2:1}$) è riportata nella tabella 5.3.1.

Il campione di *Scenedesmus sp* contiene, invece, una frazione lipidica pari a 11,3% del peso della biomassa algale.

Nel caso di *Nannochloropsis gaditana*, si ottiene il valore di frazione lipidica più elevato, pari al 25,7 % in peso. Questo valore è risultato il più alto tra le tre alghe studiate.

I dati di letteratura (Gouveia L. et al., 2009), riportano valori riscontrati, di frazione lipidica, compresi tra il 20 e il 30 % in peso, sul bilancio totale dell'alga.

Dunaliella salina, infine, ha presentato una frazione lipidica di 1,81 % in peso, un valore basso a causa della sottostima dovuta ai sali rimasti durante l'essiccazione dell'acqua di coltura, che ha una salinità del 200‰. Tenuto conto che i sali rappresentano l'86 % del peso del campione, la frazione lipidica della biomassa organica (ash-free) è del 12,9 % in peso.

I valori ottenuti, con il metodo estrattivo a freddo, hanno fornito dei valori appena più bassi rispetto a quelli trovati in letteratura, pari a 14-20 % in peso (Fried A., 1982; Gouveia L. et al., 2009; Canahci M. et al., 2001), tenuto conto che le

nostre colture, a differenza di quelle riportate in letteratura, non sono state sottoposte all'aggiunta di CO₂.

% in peso	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Nannocloropsis gaditana</i>	<i>Scenedesmus sp</i>
Media	1,8	25,7	11,3
n° campioni replicati	n=2	n=3	n=6
Dev Stand.	0,03	0,35	0,42

Tab. 5.3.1 – Lipidi estratti dai campioni di alga liofilizzata, con il metodo a freddo. (Medie e deviazione standard espresse in % in peso sul campione incluse le ceneri.)

Estrazioni a caldo.

Questa seconda tecnica estrattiva è un'estrazione sequenziale a riflusso, prima con esano e poi con CHCl₃-MeOH, che ha l'obiettivo di verificare l'eventuale aumento delle quantità di lipidi estratti e separazione degli stessi in due frazioni a diverse polarità.

I risultati, riportati nella tabella 5.3.2. mostrano come l'estrazione a caldo di *Dunaliella salina* ha estratto con l'esano 18,7 mg di lipidi, per g di biomassa, e 34,9 mg/g di lipidi con la miscela di CHCl₃-MeOH (dato corretto a causa della frazione di sale ottenuta, attraverso l'estrazione con CHCl₃-MeOH, insieme all'estratto lipidico. Il sale era pari all'86 % in peso del campione).

La quantità totale di lipidi (5,4 %) è superiore rispetto a quelle effettuate con sonicazione a temperatura ambiente. La frazione di lipidi estraibili con esano è risultata molto bassa.

Per quanto riguarda invece *Scenedesmus sp.*, la somma dei valori estratti con i due solventi (8,9 %), non si è discostata di molto dal valore ottenuto con la procedura a freddo (11,3 %). La frazione, estratta con esano (3,06 mg/g), è molto minore rispetto alla frazione estratta con la soluzione CHCl₃-MeOH (85,4 mg/g).

Infine, anche nel caso di *Nannochloropsis gaditana* il peso della frazione lipidica estratta (23,5 %) è simile a quello ottenuto con la procedura estrattiva precedente (25,7 %), e la frazione estraibile in esano (11,7 %) è molto più bassa della frazione in CHCl₃-MeOH (223 %).

	<i>Scenedesmus sp.</i>	<i>N. gaditana</i>	<i>D. salina</i>
n° repliche	2	2	2
Fraz. ESANO	3,06	11,71	18,72
Fraz. CHCl ₃ -MeOH	85,39	222,80	34,90
Somma fraz. (mg/g)	88,45	234,50	53,62
% in peso (su campione)	8,85	23,45	5,36
% in peso (su biomassa)	8,85	24,68 *	38,29 *

Tab. 5.3.2 - Tabella riassuntiva dei valori di frazione lipidica estratta durante la procedura a caldo nelle due fasi, frazione in esano e frazione in CHCl₃-Metanolo.

(*) Il dato è stato corretto tenendo conto del contenuto di sali estratti.

I risultati ottenuti nell'ambito della tesi sono stati anche confrontati con i dati pubblicati in letteratura, in cui *Dunaliella salina* risulta avere una frazione lipidica, pari a 45-55 % in peso della biomassa. Della frazione lipidica, sempre riferendoci alla biomassa totale, il 30 % in peso è risultato essere costituito da idrocarburi alifatici (Tornabene T.G. et al., 1980).

Nello specifico, le analisi cromatografiche hanno evidenziato che gli acidi grassi presenti nelle percentuali maggiori, sono l'**acido palmitico** (20,6 %), l'**acido linolenico** (12,5 %), l'**acido palmitolenico** (10,7 %), l'**acido palmitoleico** (7,8 %) e l'**acido oleico** (6,0 %).

Altri studi, come (Mourente G., 1990) hanno confermato questi acidi grassi come quelli maggiormente presenti. Nello specifico dell'articolo citato, gli acidi grassi evidenziati sono l'acido palmitoleico (35,0 %), l'acido linolenico (15,6 %), l'acido palmitico (10,6 %), l'acido oleico (6,3 %) e l'acido palmitolenico (3,5 %).

Per quanto riguarda *Nannochloropsis gaditana* (Mourente G., 1990) la frazione lipidica è risultata pari a 16-17 % in peso, rispetto alla biomassa.

Le analisi cromatografiche hanno messo in evidenza gli acidi grassi più abbondanti all'interno della frazione lipidica, ovvero **acido palmitoleico** (28,6 %), **acido palmitico** (17,3 %), **acido arachidonico** (17,2 %) e **acido palmitolenico** (14,0 %).

Infine, dagli studi letti, riguardanti *Scenedesmus sp.*, è risultato che la frazione lipidica è compresa tra valori pari a 9-12 % (Yoo C, 2009) e che gli acidi grassi principalmente presenti sono gli **acidi palmitico**, l'**acido palmitoleico** e l'**acido linolenico**.

5.4 – Pirolisi da banco.

Il bio-olio ottenuto da *Scenedesmus sp.*, attraverso la pirolisi da banco, è risultato essere in parte solubile in esano ed in parte solubile in acetone.

La resa dalla biomassa originale è stata del 23 %, suddivisa in 4,8 % solubile in esano e 18,2 % solubile in acetone, mentre la resa della biomassa già estratta è scesa al 13 %, suddivisa in 2,5 % solubile in esano e 10,5 % solubile in acetone (Tab.5.4.1).

	g pirolizzati	temp. °C	tempo min.	Rese % olio solubile in esano	Rese % olio solubile in acetone	Rese totale %	Char %
Scenedesmus Originale	1,16	500	5	4,8	18,2	23	41
Scenedesmus residua	0,75	500	5	2,5	10,5	13	34

Tabella 5.4.1 – Rese percentuali delle frazioni solubili in esano, acetone e totale. Inoltre è riportato il valore di Char che si forma.

In entrambi i casi le rese sono state superiori alle rese ottenute dalle estrazioni con solvente, che al massimo sono state pari a 8-11 %.

Le analisi GC-MS hanno evidenziato la presenza, nel pirolizzato solubile in esano, di idrocarburi alifatici a catena lunga provenienti dalla pirolisi degli acidi grassi e di composti organici derivanti dalla degradazione termica di altri costituenti, come i pigmenti fotosintetici e le proteine.

Nella tabella 5.4.2 sono riportati i valori, espressi in percentuale relativa rispetto prodotti quantificati, dei principali composti identificati con il GC/MS nelle due frazioni, il bio-olio solubile in esano è riportato nella tabella di sinistra, mentre il bio-olio solubile in acetone è riportato nella tabella di destra.

Frazione estraibile in esano

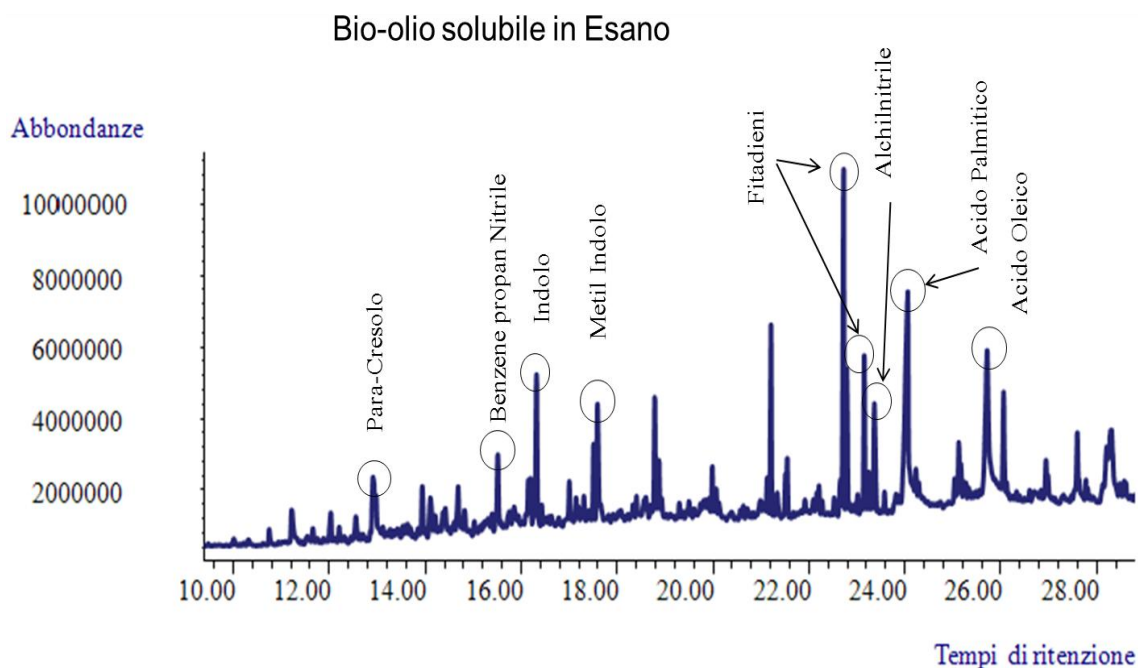
Para-Cresolo	4,27
Benzene Propane Nitrile	4,83
Indolo	7,26
Metilindolo	7,09
Fitadieni 1	11,42
Fitadieni 2	7,25
Alchilnitrili	6,71
Acido Palmitico	27,30
Acido Oleico	23,87

Frazione estraibile in acetone

Fenolo	4,43
Ciclopentenone	1,73
Orto-Cresolo	1,30
Para-Cresolo	12,26
Dimetil-Fenoli	3,69
Dimetil-Fenoli	5,70
Indolo	8,19
Metilindolo	9,86
Fitadieni 1	6,90
Fitadieni 2	5,43
Prolina-Leucina (DKP)	5,99
Acido Palmitico	20,06
Acido Oleico	14,46

Tabella 5.4.2 – Percentuali relative dei composti identificati nelle due frazioni, esano e acetone, del bio-olio derivato da *Scenedesmus sp.*.

In figura 5.4.3 sono riportati i cromatogrammi relativi alle due frazioni, prima quella solubile in esano, che evidenzia la presenza di idrocarburi alifatici, e poi quella solubile in acetone.



Bio-olio solubile in Acetone

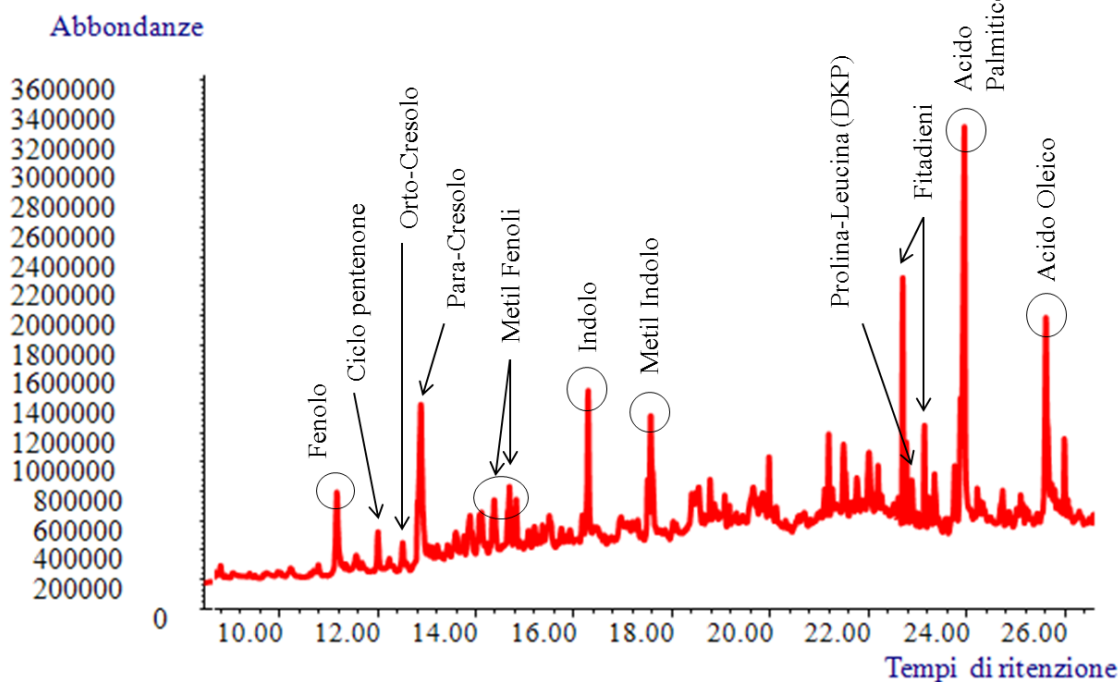


Fig. 5.4.3 – Cromatogrammi relativi alle frazioni di bio-olio solubili in esano (sopra) e acetone (sotto).

La resa del bio-olio ottenuto dalla pirolisi di *Scenedesmus sp.* ha avuto delle rese comprese tra 10 e 20%, con una frazione significativa di composti solubili in esano ed un char con rese comprese tra 30 e 40%.

Tuttavia, si deve notare che entrambe le frazioni di bio-olio contengono diversi composti azotati, come indolo, dichetopiperazine e alchilnitrili.

Proprio questa presenza di azoto risulta essere un problema nella produzione di combustibili poiché legata alle emissioni di NO_x .

5.5 – Analisi degli esteri metilici degli acidi grassi (FAME).

La resa in FAME è stata determinata tramite GC-FID utilizzando l'estere metilico dell'acido nonandecanoico come standard interno.

Esempi di cromatogrammi relativi alle analisi GC-FID sono riportati nella figura 5.5.3. Nella tabella 5.5.1 sono riportate le quantità dei principali FAME espresse in % in peso sul campione di alga liofilizzata. La quantità totale di FAME ottenibile dalle alghe, ottenuta dalla somma delle % dei singoli FAME, è riportata in tabella 5.5.2.

Questi valori forniscono una stima della quantità di biodiesel che potrebbe essere ricavata dalla biomassa.

Da *Dunaliella salina* si ottiene una percentuale di FAME pari allo 0,76 % ($\pm 0,12$) in peso. Questo valore è piccolo per il fatto che la biomassa si trova mescolata ad una considerevole quantità di sale, proveniente dal mezzo di coltura altamente salino.

Nannochloropsis gaditana, invece, presenta un contenuto di FAME pari a 5,19 % ($\pm 0,06$) del peso dell'alga.

Un dato considerato come non particolarmente interessante, soprattutto tenendo in considerazione il fatto che necessita di lungo periodo di crescita e di sviluppo per la produzione della sua biomassa.

Infine, per quanto riguarda *Scenedesmus sp.*, la resa di FAME è del 7,23 % ($\pm 0,59$) in peso e risulta interessante se considerata in relazione alla velocità di replicazione maggiore di questa microalga rispetto a *Nannochloropsis gaditana*.

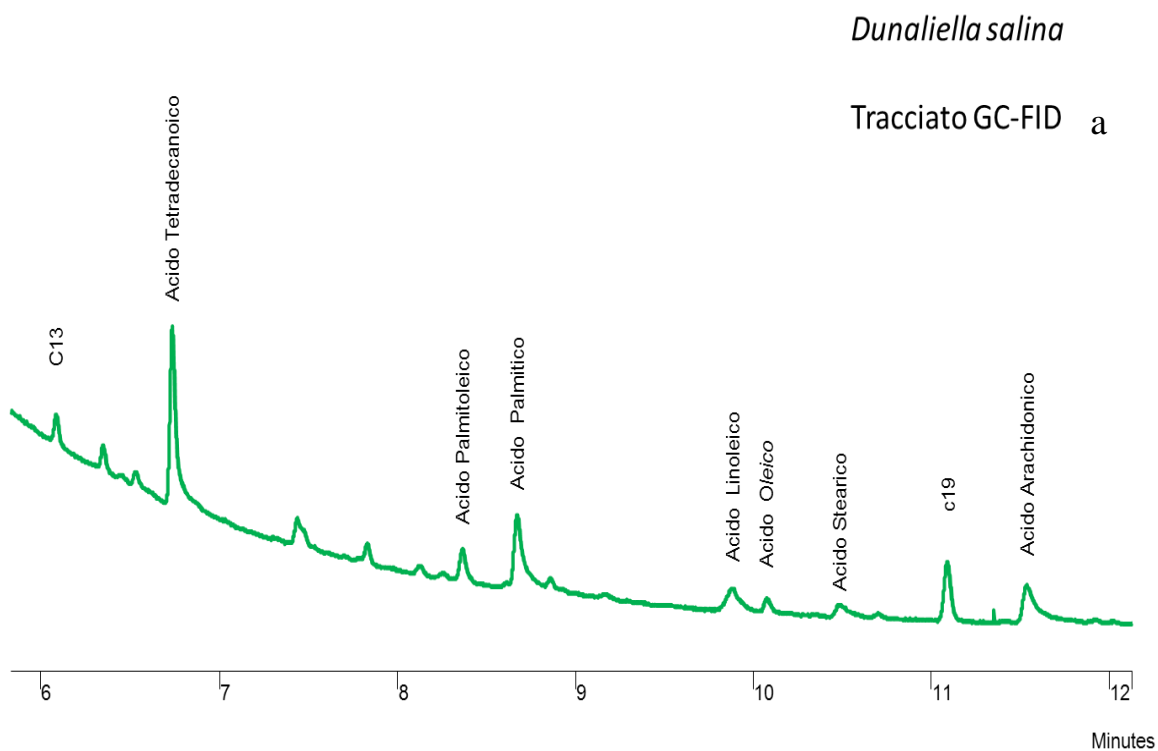
Le tre specie di microalghe presentano una composizione di acidi grassi molto diversa (tab. 5.5.1), in quanto *N. gaditana* presenta una predominanza di acido palmitico (27 %) e acido palmitoleico (34 %) e *Scenedesmus sp.* è caratterizzata dalla presenza di acidi grassi insaturi a 18 atomi di carbonio (linoleico e oleico).

	% in peso sul campione				Deviazione Standard (% in peso)			
	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>		<i>Dunaliella salina</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	
Acido Laurico	0,01	0,10	0,08		0,02	0,10		0,00
Acido Miristico	0,35	0,07	0,26		0,07	0,03		0,01
Acido Palmitoleico	0,06	0,26	1,76		0,01	0,10		0,02
Acido Palmitico	0,17	1,29	1,40		0,03	0,04		0,03
Acido Linoleico	0,04	2,95	0,05		0,04	0,21		0,00
Acido Oleico	0,01	2,15	0,56		0,01	0,12		0,01
Acido Stearico	0,03	0,28	0,14		0,01	0,05		0,00
Acido Arachidonico	0,09	0,00	0,79		0,04	0,01		0,01
Acido Eicosapentenoico	0,00	0,12	0,15		0,00	0,10		0,01
Totale FAME	0,76	7,23	5,19		0,12	0,59		0,06
	Percentuale relativa degli acidi grassi				Deviazione Standard (% relativa)			
	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>		<i>Dunaliella salina</i>	<i>Scenedesmus sp.</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	
Acido Laurico	1,35	1,25	1,63		1,91	1,30		0,22
Acido Miristico	45,83	0,97	4,90		1,29	0,30		0,23
Acido Palmitoleico	7,41	3,62	33,91		0,14	1,33		0,39
Acido Palmitico	22,50	17,90	26,84		0,68	0,92		1,64
Acido Linoleico	5,96	40,83	0,88		6,05	0,91		0,26
Acido Oleico	1,07	29,80	10,82		1,51	1,32		0,50
Acido Stearico	4,08	3,88	2,68		2,41	0,47		0,17
Acido Arachidonico	11,80	0,06	15,30		2,92	0,11		0,56
Acido Eicosapentenoico	0,00	1,69	3,04		0,00	1,30		0,80

Tab. 5.5.1 Riassunto dei valori medi di FAME e relative deviazioni standard, espressi in percentuale in peso sul campione totale (sopra). Ed espressi in abbondanza relativa (sotto).

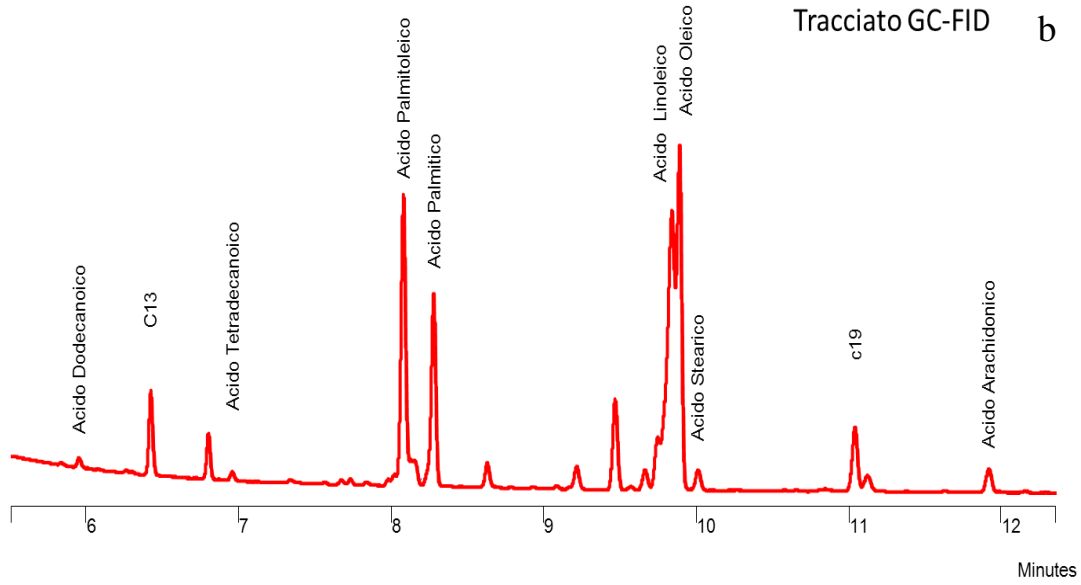
FAME	% in peso	Dev. St. (% in peso)	n° repliche
<i>Dunaliella salina</i>	0,76	± 0,12	n=2
<i>Scenedesmus sp.</i>	7,23	± 0,59	n=3
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	5,19	± 0,06	n=3

Tab. 5.5.2 – Percentuale in peso di FAME, ottenuti dai campioni di biomassa algale liofilizzata, attraverso la procedura MeOH-BF₃ (AOAC-IUPAC).



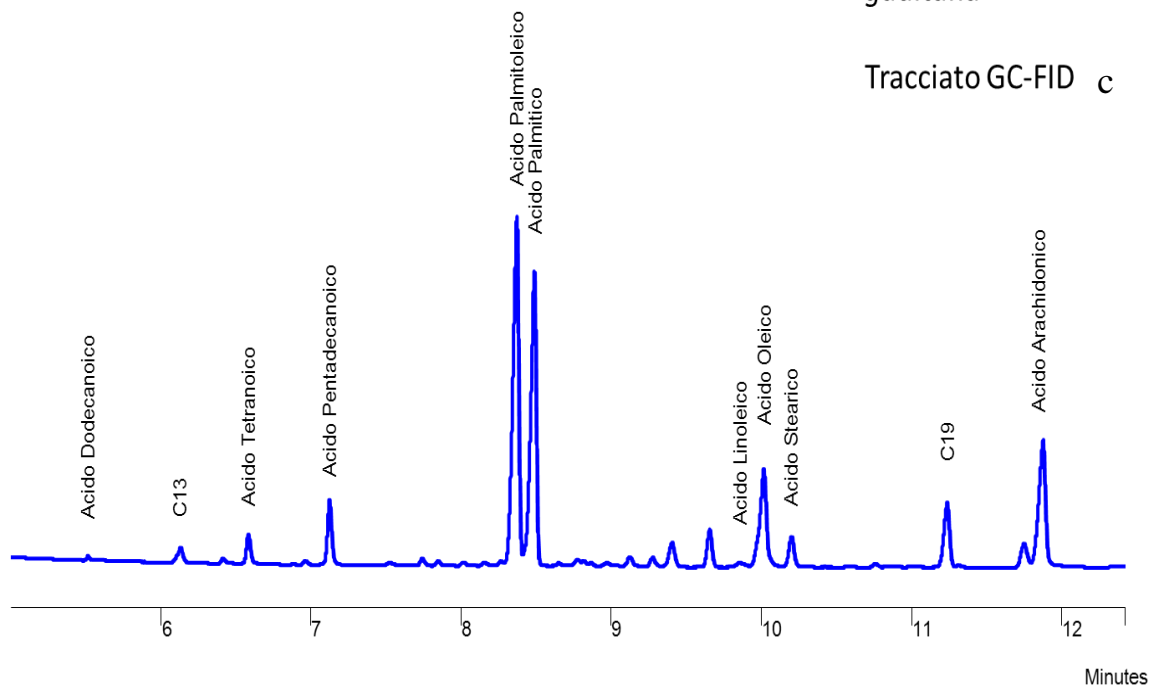
Scenedesmus sp.

Tracciato GC-FID **b**



*Nannochloropsis
gaditana*

Tracciato GC-FID **c**



5.5.3 – Tracciati GC-FID ottenuti dalla reazione di transesterificazione degli acidi grassi delle tre microalghe analizzate, con, in evidenza, gli acidi metilesteri contenuti.

Sono presenti le tre alghe (a) *Dunaliella salina*, (b) *Scenedesmus sp.*, (c) *Nannochloropsis gaditana*.

5.6 – Composizione chimica.

Nella tabella 5.6.1 sono stati riportate le percentuali in peso, espresse in relazione alla biomassa effettiva (sottratta la frazione dei sali “esterni”), delle proteine e dei carboidrati, misurate tramite analisi chimiche, dei lipidi, determinati per pesata, delle ceneri e dell’acqua (metodo Karl-Fischer) nei campioni liofilizzati.

Le analisi condotte su *Nannochloropsis gaditana*, hanno presentato dei valori percentuali delle diverse componenti pari a 10 %, per i polisaccaridi, 9,9 % per le proteine, 15 % per le ceneri, 4,2 % per l’umidità e 38 % per i lipidi.

Per quanto riguarda *Scenedesmus sp.* le misure effettuate hanno evidenziato valori percentuali di 16,2 % per i polisaccaridi, 10,5 % per le proteine, 24,6 % per le ceneri, 15,0 % per l’umidità e 8,8 % per i lipidi.

La somma delle percentuali dei composti, nel caso di *Scenedesmus sp.*, arriva solo al 75%. Probabilmente a causa di una degradazione dei carbonati. Ma è anche possibile che i lipidi siano stati sottostimati per la presenza algaenani (Allard B. et all., 1998; Blokkera P. et all., 1998), che sono elementi non estraibili con i solventi e non volatilizzabili con il trattamento di valutazione delle ceneri, anche se composti organici.

Mentre le analisi condotte su *Dunaliella salina*, hanno messo in evidenza valori percentuali pari a 11 % per i polisaccaridi, 29 % per le proteine, 15 % per le ceneri, 4,2 % per l’umidità e 38 % per i lipidi.

Tuttavia, le elevate quantità di sali presenti nel campione, hanno reso complesso e difficile la valutazione dei valori ottenuti per queste microalghe, poiché cresce a salinità piuttosto elevate (200‰).

	Polisaccaridi	Proteine	Lipidi	Ceneri %	H ₂ O (K-F)	Totale
Dunaliella SALINA	10,7	28,9	38,29	14,93	4,21	97,03
Nannochloropsis GADITANA	9,98	9,90	24,68	37,74	12,84	95,14
Scenedesmus SP.	16,15	10,5	8,85	24,65	15,05	75,55

5.6.1 – Nella tabella riassuntiva sono riportate le concentrazioni dei diversi costituenti, della biomassa algale, espressi in percentuale sul peso.

Infine, in tabella 5.6.2 sono mostrati, i risultati dell'analisi elementare dei campioni algali presi in esame (eccezion fatta per *D. salina*, a causa dell'elevato contenuto di sali). I valori sono stati calcolati direttamente dal CHNS, mentre il valore dell'ossigeno (O) è stato ottenuto attraverso l'interpolazione degli altri dati con il valore delle ceneri (vedi tab. 5.6.1).

Biomassa algale	N %	C %	H %	S %	O %
<i>Scenedesmus sp.</i>	5,8	34,5	5,3	0,3	29,5
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	3,1	24,7	4,5	0,7	26,1

Tabella 5.6.2 – Valori percentuali degli elementi principali quantificati attraverso l'analisi elementare e delle ceneri.

Capitolo 6 – Conclusioni.

Lo studio di questa tesi ha messo a confronto tre specie di microalghe, per cui esistono, già utilizzi applicativi diversi come potenziali risorse per sviluppare biocombustibili.

Le tre specie crescono in ambienti acquatici a diverse salinità, ad esempio *Scenedesmus sp.* a S=0,5 ‰, *Nannochloropsis gaditana* a S=35 ‰ e *Dunaliella salina* a S=200 ‰.

Le tre microalghe sono state coltivate nelle condizioni ottimali di crescita tipiche di ciascuna specie, ma sono state sottoposte, ove possibile, allo stesso procedimento di raccolta, separazione e caratterizzazione chimica.

Delle tre specie, *Scenedesmus sp.*, ha presentato il tasso di crescita più alto (0,60 day⁻¹) raggiungendo la fase stazionaria in due settimane, contro le quattro- cinque settimane necessarie rispettivamente a *N. gaditana* e *D. salina* per arrivare alla fase stazionaria.

La concentrazione massima cellulare è stata raggiunta da *N. gaditana* (con 15.154.896 cell/ml), che però ha presentato notevoli difficoltà nella fase di raccolta a causa delle piccole dimensioni cellulari, tuttavia la biomassa maggiore è stata prodotta da *Scenedesmus sp.* in termini di 140 mg/L.

D. salina ha invece delineato la problematicità dovuta alle alte concentrazioni di sali nel mezzo di coltura.

Lo studio condotto per mezzo della pirolisi analitica sulle tre biomasse, al fine di stimare il contenuto lipidico durante le fasi di crescita, non ha evidenziato particolari differenze.

Il contenuto di lipidi totali, estratti con CHCl₃-MeOH a refluxo, è aumentato nell'ordine da *D. salina* (5,4 %), a *Scenedesmus sp.* (8,8 %), a *N. gaditana* (23 %) se riferiti alla biomassa totale liofilizzata, mentre la quantità di lipidi estratta sulla base della biomassa organica (eliminato il sale dovuto al terreno di coltura), ha delineato l'ordine *Scenedesmus sp.* (8,8 %), *N. gaditana* (25 %) *D. salina* (38 %).

Per tutte le specie, prese in esame, la quantità di frazione di lipidi estraibile con esano rappresenta una frazione modesta del totale (3-5 %).

Questa particolare frazione ricercata, poiché più affine ai carburanti tradizionali, è risultata essere molto bassa per tutte le specie esaminate a causa del fatto che l'esano non è in grado di rompere le pareti cellulari. Infatti, senza un pre-trattamento di tipo chimico (solventi), termico o fisico (sonicazione), l'esano non è in grado di estrarre tutta la frazione lipidica, poiché non ne ha l'opportunità.

Gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) rappresentativi del biodiesel ottenibile dalla biomassa totale, sono ottenuti in quantità pari al 0,76 % per *D. salina*, 5,2 % per *N. gaditana* e 7,2 % per *Scenedesmus sp.* rispetto alla biomassa totale e corrispondono, rispettivamente, a 5,1 % per *D. salina*, 5,42 % per *N. gaditana* e 7,2 % per *Scenedesmus sp.* per la biomassa organica.

Gli studi pirolitici, inoltre, hanno messo in luce la possibilità di ottenere, da *Scenedesmus sp.*, un bio-olio con rese del 23 e 13 % rispettivamente dal campione originale e da quello già estratto. All'interno di questi oli, le frazioni solubili in esano sono state pari a 5 e 2,5 %, rispettivamente per il campione originale e per quello già estratto.

Nannochloropsis gaditana, pur risultando interessante da un punto di vista della produzione lipidica particolarmente alta, ha dimostrato di avere due punti deboli, come la crescita lenta (4 settimane) e la difficile fase di raccolta.

Inoltre, la presenza di sali risulta essere un altro problema nelle fasi estrattive e di transesterificazione, poiché interferisce con le reazioni, diminuendone la resa. Probabilmente, gli studi attualmente in corso su specie di *Nannochloropsis* adattate all'acqua dolce, riusciranno a risolvere questi problemi e a rendere quest'alga più competitiva, così come il fatto di aumentare la velocità di crescita con aggiunta di CO₂ o terreni.

Infine, *Dunaliella salina* è risultata la meno adatta a questo tipo di riutilizzo, proprio per la sua particolare lentezza nello sviluppo e la presenza di elevate quantità di sali, dovuti al terreno di coltura in cui cresce.

In conclusione, in base a questo articolato studio comprensivo delle analisi dei FAME e delle analisi effettuate sui bio-oli, è risultato che la biomassa di *Scenedesmus sp.* presenta le migliori caratteristiche in termini di velocità di

crescita, facilità di raccolta, minore contenuto di sali, maggiori rese lipidiche, di FAME e di oli di pirolisi ed è quindi quella potenzialmente più adatta ad un utilizzo per la produzione di biocombustibili.

Ringraziamenti

In occasione della conclusione di questo lavoro di tesi, desidero ringraziare per tutto l'aiuto e la pazienza, tutto il **Pyro-TEAM**.

In primo luogo desidero ringraziare il Professor Daniele Fabbri, per l'aiuto datomi in questo lavoro e per la paziente opera di correzione scrittoria, "stilistica" e non solo.

Desidero ringraziare, inoltre, la Professoressa Rossella Pistocchi e la Dott.ssa Franca Guerrini per l'aiuto datomi, per le pazienti ore in laboratorio e per l'appoggio incondizionato ai miei test.

Ringrazio infine, in modo particolare il Dott. Cristian Torri, per avermi guidato in questo percorso e per avermi insegnato, disinteressatamente, così tanto dentro e fuori dall'università.

Un'ulteriore ringraziamento va poi a tutti i ragazzi e ai tecnici dei laboratori: Chiara, Alessio, Danilo, Manuela, Elena, Helena, Alessandro, Stefan-ino e Stefan-one.

Infine, ultimo ringraziamento anche se certamente non per importanza, va alla mia famiglia, annessi e connessi, per la fiducia, la paziente attesa e "il tifo" e agli amici, dell'università e non, che hanno reso questi anni universitari un'esperienza ineguagliabile.

Riferimenti bibliografici:

Articoli.

- Allard B.; Templierag J., Largeauag C.; “An improved method for the isolation of artifact-free algaenans from microalgae”; *Organic Geochemistry*; Vol. 28; 9-10; June(1998); pp. 543-548.
- An, J.Y., Sim, S.JJ., Lee S., Kim B.W.; “Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. J.”; *Applied Phycology*; (2003); 15 (2-3); pp. 185-191.
- ARPA; Edizione 2003 dell'Annuario dei Dati Ambientali; realizzato in cooperazione dal Sistema Agenziale APAT/ARPA/APPA; (2003).
- Appell H.R., Fu Y.C., Friedman S., Yavorsky P.M., Wender, I.; “Converting organic wastes to oil: A replenishable energy source.”; U.S. Dept. of Interior, Bur. Mines Rept. Invest.; (1971); pp. 7560.
- Becker E.W.; “Microalgae: Biotechnology and Microbiology.”; Baddiley J., Carey N.H., Higgins I.J., Potter W.G Edit.; *Cambridge Studies in Biotechnology*; Cambridge (1993).
- Benemann J.R.; “Hydrogen production by microalgae.”; *Journal of Applied Phycology*; 291(2000); Vol. 12; pp. 291-300.
- Beriens C.; “Review R2”; *International Journal of chemical reactor Engineering*; 6 (2008).
- Bligh E., Dyer W.; “A rapid method for total lipid extraction and purification.”; *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*; 37(1959); pp. 911-917.

- Blokkera P., Schoutena S., Endeb H., Leeuwa J.W., Hatcher P.G., Damstéa J.S.S.; “Chemical structure of algaenans from the fresh water algae *Tetraedron minimum*, *Scenedesmus communis* and *Pediastrum boryanum*.”; *Organic Geochemistry*; Vol. 29; 5-7; Nov(1998); pp. 1453-1468.

- Boocock D.G B., Mackay D., Franco H., Lee P.; “The production of synthetic organic liquids from wood using a modified nickel catalyst.”; *The Canadian Journal of Chemical Engineering*; Vol. 58; 4, Aug(1980); pp. 466–469.

- Brown T.M., Duan P., Savage P.E.; “Hydrothermal liquefaction and gasification of *Nannochloropsis* sp.”; *Energy fuels*; 24(2010); pp. 3639-3646.

- Buggeln R. G., Darley M.W.; “Algal Biology: A Physiological Approach.”; *Phycologia*; Dec. (1983); Vol. 22; No. 4; pp. 457-458.

- Canahci M., Van Gerpen J.; “Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids”; *American Society of Agricultural Engineers*; (2001); Vol. 44(6); pp.1429-1436.

- Canakci M., Van Gerpen J.; “Acid-catalyzed esterification of *Zanthoxylum bungeanum* seed oil with high free fatty acids for biodiesel production.”; *Bioresource Technology*; Vol. 99; 18; Dec.(2008); pp. 8995-8998.

- Chisti Y.; “Biodiesel from microalgae”; *Biotechnology Advances*; 25 (2007); pp. 294–306.

- Chu S.P.; “ The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae.” Part I; *Methods and culture media*; *J. Ecologiae*; (1942)30; pp. 284-325.

- Coban-Yildiz Y., Fabbri D., Tartari D., Tugrul S., Gaines A.F.; “Application of pyrolysis-GC/MS for the characterisation of suspended particulate organic matter in the Mediterranean sea: a comparison with Black sea.”, *Organic Geochemistry* (Elsevier), 31 (2000), pp. 1627-1639.

- Cozzani V.; Nicolella C.; Petarca L.; Rovatti M.; Tognotti L.; “A Fundamental Study on Conventional Pyrolysis of a Refuse-Derived Fuel.”; *Industrial & Engineering Chemistry Research* (1995); 34(2006); pp.20.
- Demirbas A., S. Karslioglu; “Biodiesel Production Facilities from Vegetable Oils and Animal Fats”; *Energy Sources; Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*; (2002)29; pp. 133-141.
- Demirbas A.; “Biodiesel: a realistic fuel alternative for Diesel engines.”; Springer-Verlag London Limited; Londra (2008).
- Demirbas A.; “Biofuels resource, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections.”; *Energy conversion and management*; 49(2008); pp. 2106-2116.
- Demirbas A.; “Effect of lignin content on aqueous liquefaction products of biomass”; *Energy conversion and management*; 36 (1995); 1735.
- Demirbas A.; “Progress and recent trends in biofuels.”; *Progress in energy and combustion science.*; (2007); 33; pp. 1-18.)
- Demirbas A.; “Sustainable development of hydropower energy in Turkey”; *Energy Source*; 2(2002); pp.27-40.
- Diesel R.; “The theory and construction of a rational heat engine”; traduz. B.Donkin; E&F N.SPON; Londra (1894).
- Dotea Y., Sawayama S., Inouea S., Minowaa T., Yokoyamaa S.; “Recovery of liquid fuel from hydrocarbon-rich microalgae by thermochemical liquefaction.”; *Fuel*; Vol.73; 12; Dec.(1994); pp. 1855-1857.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., & Smith, F.; “Colorimetric method for determination of sugar and related substances.”; *Anal. Chem.*; 28; (1956); pp. 350-6.

- Fabbri D., Torri C., Mancini I.; “Pyrolysis of cellulose catalysed by nanopowder metal oxides: production and characterisation of a chiral hydroxylactone and its role as building block.”; *Green Chemistry*; 9 (2007); pp.1374-1379.

- Fischer, K.; “Neues Verfahren zur massanalytischen Bestimmung des Wassergehaltes von Flüssigkeiten und festen Körpern”; *Angew. Chemie*; 48(1935); pp. 394.

- Folch J., M. Lees, Stanley G.H.S.; “A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.”; *J. Biol. Chem.*, (1957)226; pp. 497-509.

- Fried A., Tietz A., Ben-Amotz A., Eichenberger W.; “Lipid composition of the halotolerant alga, *Dunaliella bardawil*.”; *Biochimica et Biophysica Acta*; 713 (1982); pp. 419-426.

- Gavrilescu M, Chisti Y.; “A sustainable alternative for chemical industry.”; *Biotechnology Advances*; 23 (2005); pp. 471–99.

- Gebrezgabher S.A., Meuwissen M.P.M., Lansink A.G.J.M.; “Costs of Producing Biogas at Dairy Farms in The Netherlands.”; *Int. J. Food System Dynamics*; 1 (2010); pp. 26-35.

- Gouveia L., Oliveira A.C.; “Microalgae as raw material for biofuels production.”; *Society for Industrial Microbiology (Springer)*; 36 (2009); pp.269-274;

- Graham L.E., Wilcox L.W, Graham J.M.; “Algae.”; Benjamin Cummings (edit.); Pearson Hall ; San Francisco, CA; (2000).

- Guillard R.R.L., Ryther J.H.; “Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve.”; *Can. J. Microbiology*; (1962) 8; pp. 229-239.

- Gupta R.B., Demirbas A.; “Gasoline, diesel and ethanol biofuels from grasses and plants.”; Cambridge University Press; New York (2010).

- Haas MJ., McAloon AJ, Yee W.C., Foglia T.A.; “A process model to estimate biodiesel production costs”; *Bioresource Technology*; 97 (2006); pp. 671-678.

- Hara, A., Radin N.S.; “Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent.”; *Analytical Biochemistry*; 90 (1978); pp. 420-426.

- Kita K., Okada S., Sekino H.; “Thermal Pre-treatment of Wet Microalgae Harvest for Efficient Hydrocarbon Recovery”; *Applied Energy*; 87(7); (2010); pp. 2420-2423.

- Largeau C., Casadevall E., Berkaloff C., Damelinourt P.; “Site of accumulation and production of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*”; *Phytochemistry*; 19 (1980); pp. 1043-1051.

- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.; “Protein measurement with the folin phenol reagent.”; *J Biol Chem*; 75 (1951); pp. 193-265.

- Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia T.V., Shevchenko A., Schwudke D.; “Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics.”; *J Lipid Res*; (2008); 49 (5); pp. 1137-1146.

- Miao X, Wu Q, Yang C.; “Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels.”; *Anal. Appl. Pyrolysis*; 71 (2004); pp. 855.

- Miao X., Wu Q.; “Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil.”; *Bioresource Technology*; Vol. 97; 6; Apr.(2006); pp. 841-846.

- Minowa T., Yokoyama S-Y, Kishimoto M., Okakura T.; “Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction.”; *Fuel*; Vol.74;12; Dec(1995); pp.1735-1738.

- Mourente G., Lubian L.M., Odriozola J.M; “Total fatty acid composition as taxonomic index of some marine microalge used as food in marine aquaculture.”; *Hydrobiologia*; 203; (1990); pp. 147-154.

- Mulbry W., Kondrad S., Buyer J., Luthria D.L.; “Optimization of an oil extraction process for algae from the treatment of manure effluent”; *J Am Oil ChemSoc*; 86 (2009); pp. 909-915.

- Myklestad, S., Haug, A.; “Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium.”; *J. exp. mar.; Biol. Ecol.*; 9 (1972); pp.125-136.

- Oren A.; “A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005.”; *Saline Systems*; (2005); 1(2); published online 2005 July 4; pp.1746-1448.

- Pan P., Hu C., Yang W., Li Y., Dong L., Zhu L., Tong D., Qing R., Fan Y.; “The direct pirolisis and the catalytic pirolisis of *Nannochloropsis* sp. Residue for renewable bio-oils”; *Bioresource Tecnology*, 101(2010); 4593-4599.

- Persson M., Jönsson O., Wellinger A.; “Biogas Upgrading to Vehicle Fuel Standards and Grid Injection”; *IEA Bioenergy*; 4 Jun 2010; pp.5-7.

- Posten C., G. Schaub; “Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels. process view”; *Journal of Biotechnology*; 142 (2009); pp. 64–69.

- Q. Hu, M. Sommerfeld, Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A.; “Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuels production : perspectives and advances”; *The Plant Journal*; 54(2008); 621.

- Rocha J.M.S., Garcia J.E.C., Henriques M.H.F.; “Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*”; *Biomol Eng.*; 2003 Jul; 20(4-6); pp.237-42.

- Rodolfi L., Zittelli G.C., Barsanti L., Rosati G., Tredici M.R.; “Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation.”; *Biomolecular Engineering*; Vol. 20; Issues 4-6; (2003); pp. 243-248.

- Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L.; Betenbaugh, M.J.; “A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution.”; *Curr. Opin. Biotech.*; (2008); 19 (5); pp. 430–436.

- Samorì C., Torri C., Samorì G., Fabbri D., Galletti P., Guerrini F., Pistocchi R., Tagliavini E.; “Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents.”; *Bioresource Technology*; 101 (2010); pp. 3274–3279.

- Samson R., Anh Leduy; “Biogas production from anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass.”; *Biotechnology and Bioengineering*; Aug.(1982)14; Vol. 24; 8; pp. 1919–1924.

- Schampelaire L., Willy Verstraete; “Revival of the Biological Sunlight-to-Biogas Energy Conversion System.”; *Biotechnology and Bioengineering*; 1 June (2009); Vol. 103; No. 2; pp.296-304.

- Scholz, E.; «Karl Fischer Titration», Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, (1983).

- Shen Y., W. Yuan, Z. Pei, E. Mao; “Culture of Microalga *Botryococcus* in Livestock Wastewater.”; *American Society of Agricultural and Biological Engineers*; (2008); 51(4); pp. 1395-1400.

- Sheppard A.J.; “Suitability of lipid extraction procedures for gas-liquid chromatography.”; *Journal of the American Oil Chemists' Society*; (1963) 40; 10; pp. 545-548.

- Shieh W-C, Dell S., Repiča O.; “Large scale microwave-accelerated esterification of carboxylic acids with dimethyl carbonate”; Tetrahedron Letters; Vol. 43; 32; Aug.(2002); pp. 5607-5609.

- Sims R., Taylor M.; “From first- to second-generation biofuels technologies.”, IEA Bioenergy; Novembre (2008); pp. 16-32.

- Soetaert W., Vandamme E.J.; “Biofuels.”; Wiley John & Sons Edit.; Wiley Series in Renewable Resources; Chippenham (2009).

- Soxlet F.; “Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes.”; Dingler's Polytechnisches; (1879) 232; 461.

- Susilarningsih D., Djohan A.; “Biodiesel from Indigenous Indonesian marine microalgae, *Nannochloropsis* sp.”; Journal of Biotechnology Research in Tropical Region; Oct. 2009; 2; pg. 1-4.

- Tagliabue S., Gasparoli A., Bondioli P., Della Bella L.; “Quali-quantitative determination of synthetic antioxidants in biodiesel.”; 18th European biomass conference and exhibition; Lyon; 3-7 May(2010).

- Tomas C.R.; “Identifying Marine Phytoplankton.”; Academic Press. San Diego; (1996).

- Tornabene T.G., Holzer G., Peterson S.L.; “Lipid profile of the halophilic alga, *Dunaliella salina*.”; Biochemical and biophysical research communications; Vol. 96; N° 3; (1980); pp. 1349-1356.

- Tundo P., Selva M.; “The Chemistry of Dimethyl Carbonate”; Acc. Chem. Res.; (2002); 35 (9); pp. 706–716.

- Ugo Bardi; “La fine del petrolio. Combustibili fossili e prospettive energetiche nel ventunesimo secolo.”; Editori Riuniti; I edizione, settembre (2003); © Copyright Editori Riuniti; www.editoririuniti.it.

- Weldy C.S., Huesemann M.; “Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity.”; *Journal of undergraduate research*; (2007); VII; pp.115-122.

- Williams S.; “AOAC-IUPAC method. Fatty acids in oils and fats preparation of methyl esters. Final action, Boron trifluoride method.”; 14th ed. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, Arlington VA; (1984); pp. 513.

- Williams, P.J.L.; “Biofuel: microalgae cut the social and ecological costs.”; *Nature*; (2007); pp. 450- 478.

- Wood A.M., Everroad R.C., Wingard L.M.; “Cap.18 - Measuring growth rates in microalgal culture.” in: “*Algal culturing techniques*.”; Andersen R.A. edi.; Elsevier, USA; (2005); pp. 269-285.

- Xiong W., Gao C., Yan D., Wu C., Wu Q; “Double CO₂ fixation in photosynthesis–fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production”; *Biotechnology and bioengineering*; Vol. 101;7; Apr.(2009); pp. 2287-2293.

- Yoo C., Jun S.Y., Lee J.Y., Ahn C.Y., Oh H.M.; “Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide.”; *Bioresource Technology*.; 101; 1(2010); pp. 71-4.

Riferimenti web.

- Wikipedia; “http://en.wikipedia.org/wiki/Dunaliella_salina” , *Dunaliella salina*,

