

ALMA MATER STUDIORUM

UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

FACOLTÀ DI CHIMICA INDUSTRIALE

Corso di Laurea Magistrale In Chimica Industriale
Dipartimento di chimica industriale e dei materiali

PRETRATTAMENTI ENZIMATICI SU
FORSU PER LA PRODUZIONE DI BIOGAS.

TESI SPERIMENTALE

PRESENTATA DA:
Gloria Baroncini

RELATORE:
Prof. Leonardo Setti

TUTOR AZIENDALE:
Dott. Chiara Giovannini

Sessione III

Anno accademico 2010/2011

1 Sommario

1.	INTRODUZIONE:	4
1.1	La normativa di riferimento:	4
1.2	Situazione rifiuti.	6
1.2.1	La produzione di rifiuti in Europa:	6
1.2.2	La produzione di rifiuti in Italia:	8
1.3	Composizione merceologica dei rifiuti solidi urbani:	11
1.4	Problematiche di gestione della FORSU (frazione organica da RSU):	12
1.5	Composizione chimica delle biomasse trattate:	13
1.5.1	La parete cellulare vegetale :	13
1.6	Biocatalizzatori per l'idrolisi dei tessuti vegetali:	19
1.6.1	Cellulasi:	19
1.6.2	Xilanasi:	20
1.6.3	Pectinasi:	21
1.6.4	Amilasi:	22
1.7	La fermentazione anaerobica:	23
1.8	Lo smaltimento della frazione organica del rifiuto solido urbano (FORSU):	24
1.8.1	Idrolisi:	25
1.8.2	Acidogenesi:	26
1.8.3	Acetogenesi:	26
1.8.4	Metanogenesi:	27
1.9	L'influenza della temperatura:	29
1.10	le tecnologie disponibili:	29
1.10.1	Digestione "wet":	30
1.10.2	Digestione "semi-dry":	30
1.10.3	Digestione "dry":	31
1.10.4	Digestione "Dry" Batch:	32
2	MATERIALI E METODI:	34
2.1	Preparazione del reagente ADNS (acido 3,5-dinitrosalicilico):	34
2.2	Saggio per la determinazione degli zuccheri riducenti:	34
2.3	Determinazione dell'attività amilasica:	36
2.4	Determinazione dell'attività xilanasica:	37
2.5	Determinazione dell'attività pectinasica:	37
2.6	Analisi di attività enzimatica su alimenti:	38
2.7	Analisi di attività enzimatica su campione di FORSU:	38

2.8	Determinazione degli acidi grassi totali mediante saggio colorimetrico:.....	39
2.8.1	Costruzione della retta di taratura:	39
2.9	Saggio per la determinazione dell'attività lipasica:	40
3	SCOPO DELLA TESI	43
4	RISULTATI.....	46
5	CASO STUDIO:.....	89
5.1	Possibilità di applicazione di pretrattamenti enzimatici:.....	95
5.2	Bilancio economico dei pretrattamenti enzimatici	96
6	CONCLUSIONI.....	98
7	BIBLIOGRAFIA.....	103

1. INTRODUZIONE:

Dopo la rivoluzione industriale la società civile è passata da un tipo di economia agricolo-rurale ad un tipo di economia basata sull'aumento progressivo dei consumi e della produzione di beni; di conseguenza sono aumentate anche le quantità di rifiuti prodotte e le problematiche di gestione, smaltimento, impatto ambientale ad essi collegate. Nel corso degli anni, sono state emanate diverse normative che regolamentano i vari aspetti della gestione dei rifiuti incentivando sempre più il recupero e il riciclo dei materiali e la riduzione delle quantità smaltite in discarica o all'inceneritore. La legge definisce rifiuto "qualsiasi sostanza od oggetto il cui detentore si disfi o abbia deciso o abbia l'obbligo di disfarsi" e, a seconda delle sue caratteristiche, può essere classificato come rifiuto urbano o come rifiuto speciale; pericoloso o non pericoloso. Nel rifiuto urbano si ritrovano diverse tipologie di materiali, tra cui carta, plastica, vetro e sostanza organica biodegradabile. Tra queste frazioni merceologiche, quella che crea maggiori problemi per lo smaltimento dei rifiuti indifferenziati è la sostanza organica putrescibile. Essa infatti abbassa il potere calorifico dei rifiuti rendendo meno efficiente lo smaltimento in inceneritore, mentre nelle discariche dà luogo a percolato ed emissioni gassose inquinanti che devono essere raccolte e trattate adeguatamente. Per questo motivo è importante raccogliere in modo differenziato e riciclare la sostanza organica. Inoltre il materiale organico raccolto può essere usato per produrre biogas all'interno di impianti di compostaggio anaerobico, andando a coprire parte del crescente fabbisogno energetico del paese.

1.1 La normativa di riferimento:

la normativa più recente emanata in materia di ambiente e rifiuti è la direttiva europea 2008/98/CE ed è stata recepita dallo stato italiano con il DL 3 dicembre 2010, n.205. Il nuovo decreto apporta alcune modifiche alla precedente legge 152/2006 (testo unico ambientale).

Tra le modifiche riportiamo:

- Inserimento dell'articolo 178-bis (responsabilità estesa del produttore):
descrive “ le modalità e i criteri di introduzione della responsabilità estesa del produttore del prodotto, inteso come qualsiasi persona fisica o giuridica che professionalmente sviluppi, fabbrichi, trasformi, tratti, venda o importi prodotti, nell'organizzazione del sistema di gestione dei rifiuti, e nell'accettazione dei prodotti restituiti e dei rifiuti che restano dopo il loro utilizzo”
- Modifiche all'articolo 179 (criteri di priorità nella gestione dei rifiuti) : La gestione dei rifiuti avviene nel rispetto della seguente gerarchia:
 - a) prevenzione;
 - b) preparazione per il riutilizzo;
 - c) riciclaggio;
 - d) recupero di altro tipo, per esempio il recupero di energia;
 - e) smaltimento.
- Modifiche all'articolo 181 (riciclaggio e recupero dei rifiuti) che pone i seguenti obiettivi di raccolta differenziata da raggiungere entro il 2020:
 - Il 50% per RSU
 - Il 70% per i residui di costruzione, demolizione, industriali e di produzione.
- Introduzione dell'articolo 182-bis (principi di autosufficienza e prossimità) con lo scopo di ridurre il più possibile i movimenti dei rifiuti nel territorio, e dell'articolo 182-ter (rifiuti organici), volto a incoraggiare: la raccolta separata dei rifiuti organici; il trattamento degli stessi in modo da realizzare un livello elevato di protezione ambientale; l'utilizzo di materiali sicuri per l'ambiente ottenuti dai rifiuti organici, al fine di proteggere la salute umana e l'ambiente.

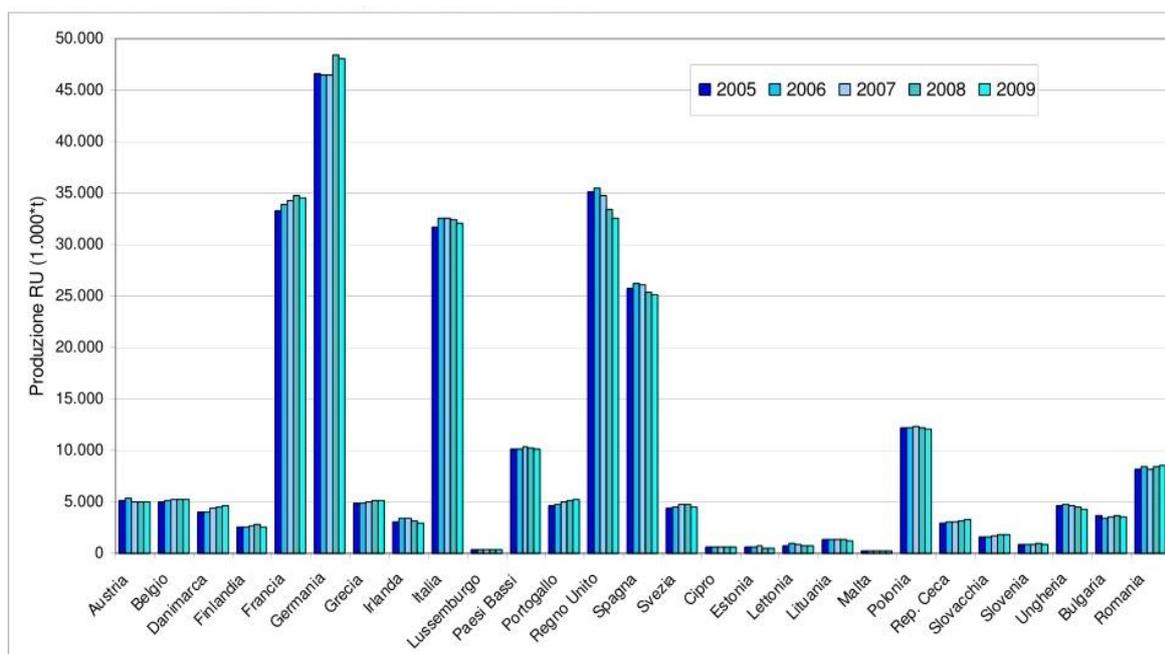
Gli intenti di questa legge sono quindi quelli di ridurre la quantità di rifiuti prodotta ed incentivare il più possibile il recupero, il riciclaggio e la raccolta differenziata, in un'ottica di indipendenza territoriale.

L'inserimento poi dell'articolo sulla responsabilità estesa del produttore è importante, contribuisce a migliorare la gestione e la riduzione dei rifiuti.

1.2 Situazione rifiuti.

1.2.1 La produzione di rifiuti in Europa:

Nel 2009 nella Comunità Europea (UE 27) si sono prodotti 255,8 milioni di tonnellate di rifiuti urbani; l'Italia con **32,1 milioni di tonnellate** si posiziona al quarto posto, dietro a Germania, Francia e Gran Bretagna.



Fonte: elaborazioni ISPRA su dati Eurostat

Figura 1-1: produzione di rifiuti urbani nell'Europa a 27 membri¹

Per quanto riguarda la produzione procapite invece lo scenario è molto diverso: i paesi meno virtuosi nel 2009 sono Danimarca (831 kg/ab anno), Cipro (775), Lussemburgo (701) e Malta (648); l'Italia è nella media europea con 532 Kg/ab anno.

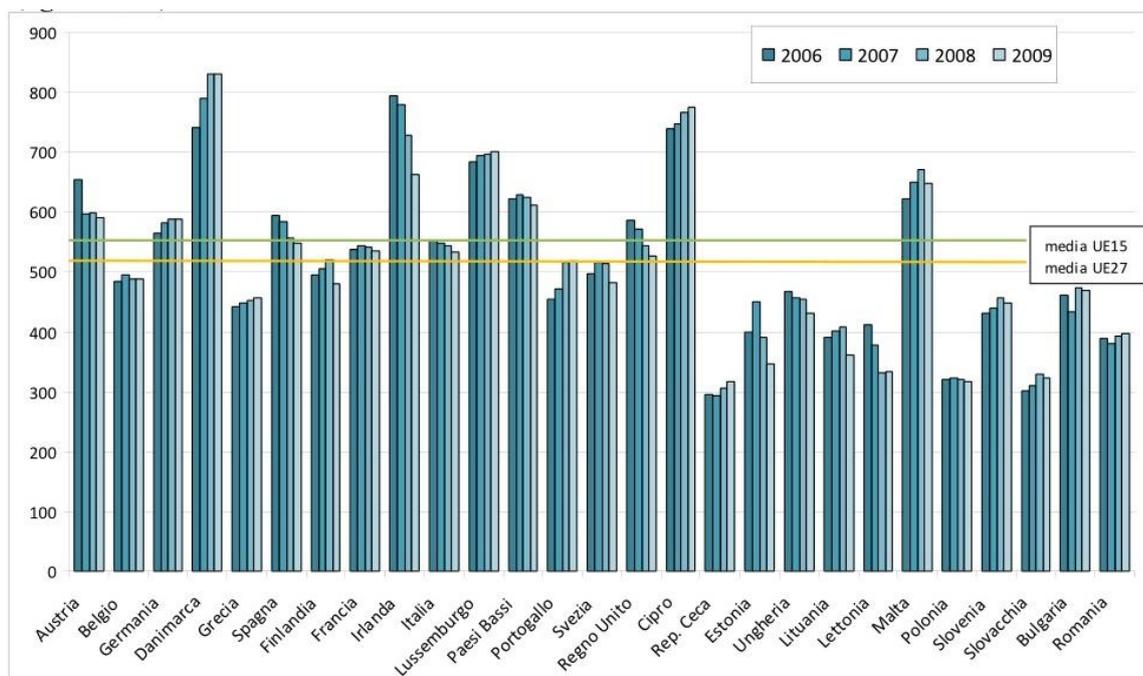


Figura 1-2: andamento della produzione procapite di rifiuti urbani in Europa, anni 2006-2009¹

La gestione dei rifiuti varia molto da paese a paese: almeno sei stati membri (Germania, Austria, Paesi Bassi, Svezia, Danimarca e Belgio) smaltiscono meno del 10% dei propri RSU in discarica. All'opposto ben 9 stati membri ricorrono allo smaltimento in discarica per quote superiori all'80%¹.

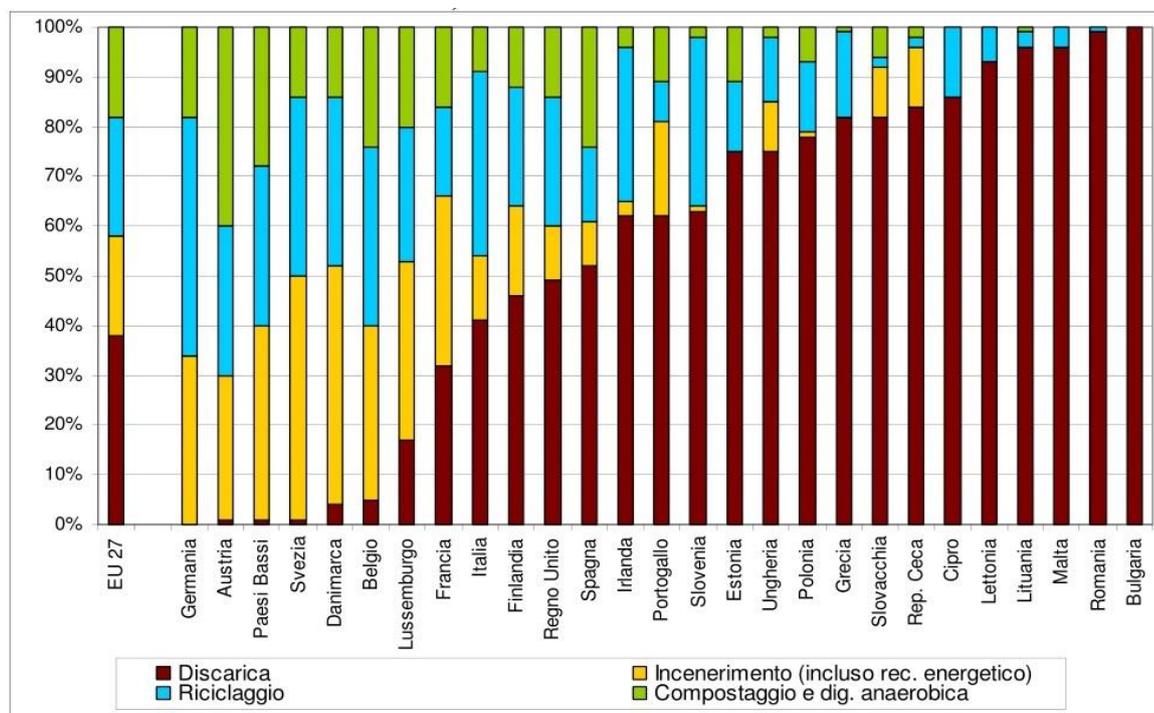
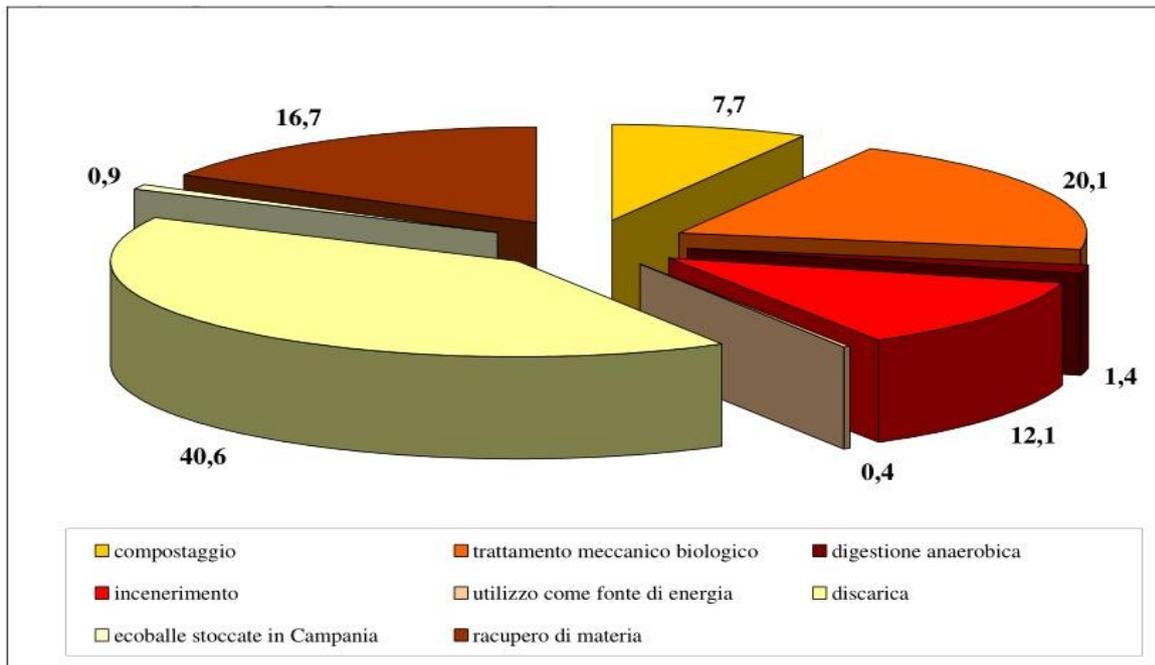


Figura 1-3: gestione dei rifiuti in Europa, anno 2009¹

L'Italia lo smaltimento in discarica è ancora abbastanza alto (41%), l'incenerimento invece è al 12%. Le percentuali di riciclo raggiunte sono piuttosto buone: 16,7% di recupero di materia; 7,7% di compostaggio e 1,4% di digestione anaerobica, a cui si aggiunge il 20,1% di trattamento meccanico biologico. L'Italia può quindi considerarsi un paese nella media, con alto potenziale di miglioramento.

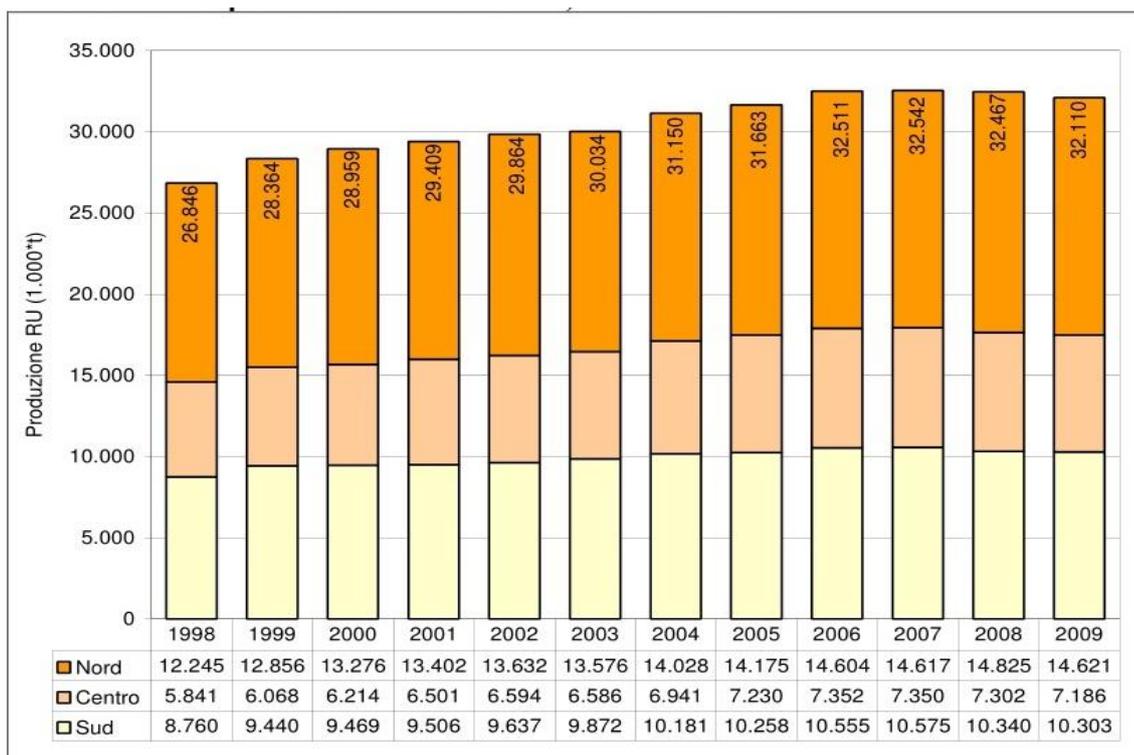


Fonte: ISPRA

Figura 1-4: la gestione dei rifiuti urbani in Italia, anno 2009¹

1.2.2 La produzione di rifiuti in Italia:

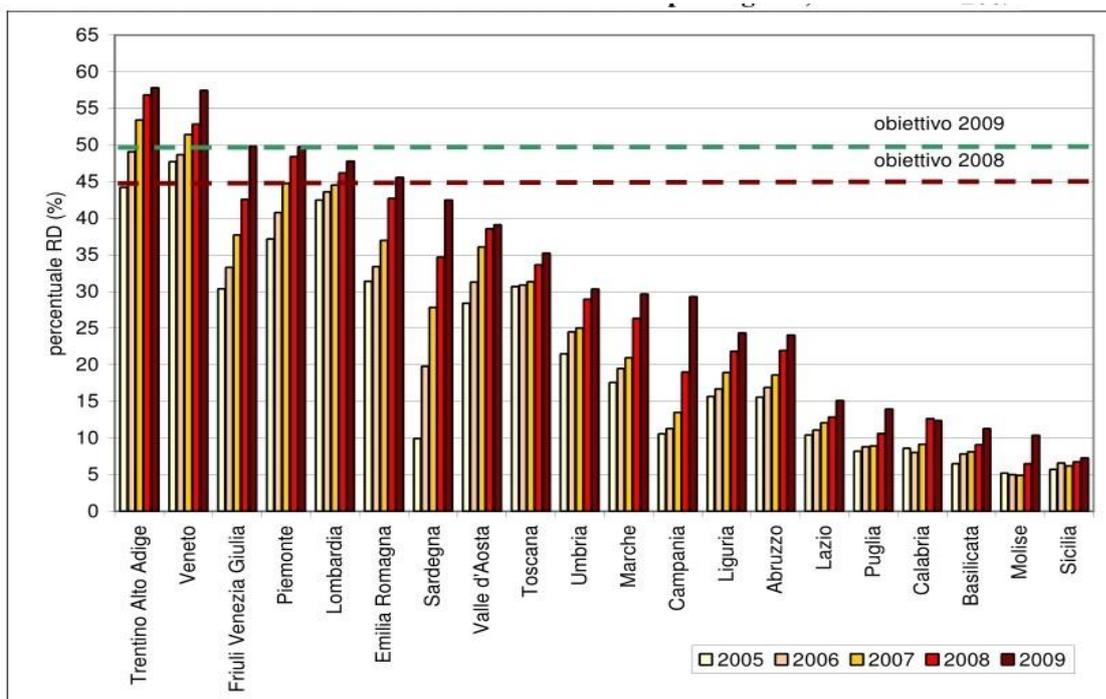
Andando ad analizzare la situazione all'interno del nostro paese si nota come negli ultimi due anni ci sia un trend in leggera decrescita nella produzione di rifiuti urbani.



Fonte: ISPRA

Figura 1-5: andamento della produzione di RSU in Italia, anni 1998-2009¹

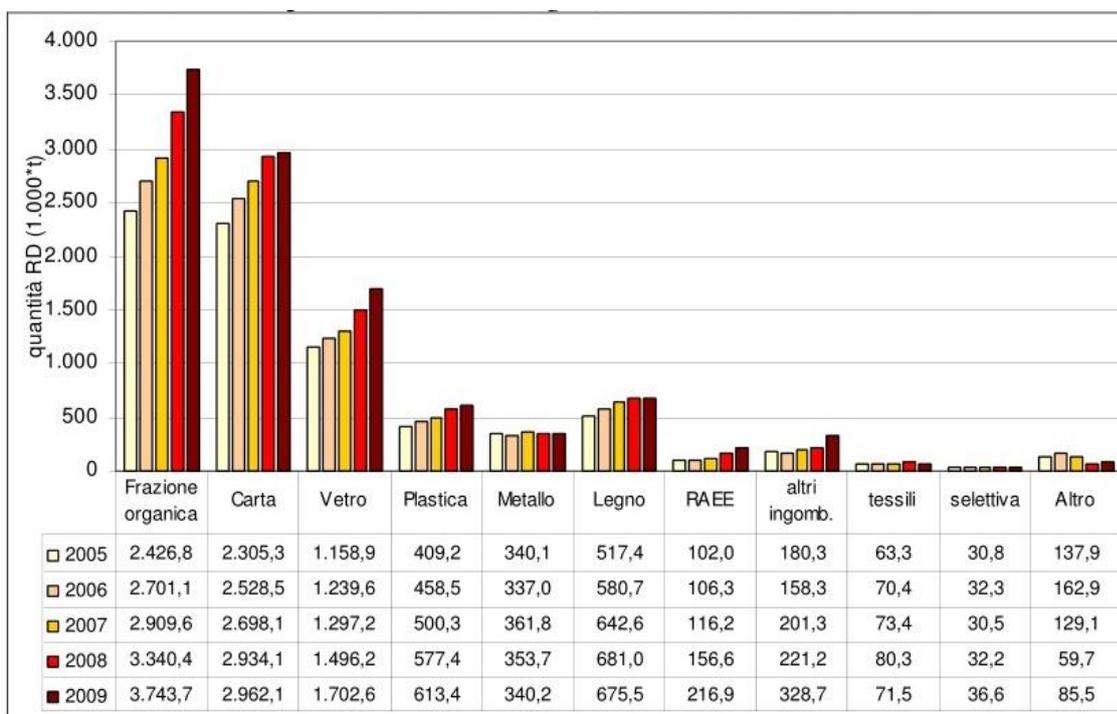
La raccolta differenziata presenta notevoli disomogeneità da nord a sud. Al nord ci sono diverse regioni che hanno raggiunto gli obiettivi 2009 posti dalla normativa, in particolare il Trentino (57,8%), il Veneto (57,5%), il Friuli (49,9%), il Piemonte (49,8%), la Lombardia (47,8%) e l'Emilia Romagna(45,6%); mentre al centro-sud ci sono sei regioni sotto il 20% di raccolta differenziata (Lazio, Molise, Sicilia, Basilicata, Puglia e Calabria).



Fonte: ISPRA

Figura 1-6: percentuali di raccolta differenziata dei rifiuti urbani per regione, anni 2005-2009

Complessivamente negli ultimi 4 anni l'aumento dell'RD in Italia è stato del 3%.



Nota: le quote relative alle frazioni vetro, plastica, metalli e legno sono date dalla somma dei quantitativi di imballaggi e di altre tipologie di rifiuti costituiti da tali materiali raccolti

Fonte: ISPRA

Figura 1-7: raccolta differenziata per frazione merceologica, anni 2005-2009

Andando ad analizzare nel dettaglio i flussi di raccolta differenziata si vede come la frazione organica (umido + verde) sia quella che registra i maggiori incrementi, con una crescita del 28,7% nell'ultimo biennio, per un ammontare di **3,7 milioni di tonnellate** raccolte nel 2009. Questi quantitativi sono destinati ad aumentare di pari passo con l'aumento della raccolta differenziata, con conseguente disponibilità di una grande quantità di materiale biodegradabile utilizzabile come fonte energetica o per il compostaggio.

1.3 Composizione merceologica dei rifiuti solidi urbani:

Oltre a definire i quantitativi di RSU prodotti è utile andare ad identificarne la composizione. I dati in letteratura a questo proposito sono abbastanza scarsi e disomogenei, per questo motivo si è deciso di utilizzare uno studio eseguito sulla provincia di Forlì-Cesena².

Tabella 1-1: risultati di analisi merceologica sui diversi contenitori stradali di rifiuti

frazioni merceologiche	contenitori stradali differenziata						indifferenziato
	plastica e metalli	carta cartone	Organico	vetro	verde	Multi materiale	
carta-cartone	5,43%	98,26%	0,22%	0,27%	0%	54,60%	20,72%
plastica-metalli	77,33%	1,74%	0,22%	1,80%	0%	37,40%	30,19%
vetro	1,58%	0,00%	0,00%	95,67%	0%	0,60%	3,58%
organico	0,16%	0,00%	31,27%	0,00%	0%	7,40%	23,28%
Verde	0,00%	0,00%	67,09%	0,00%	92,80%	0%	9,78%
RUP	5,44%	0,00%	0,00%	0,00%	0%	0%	0,27%
altri	10,07%	0,00%	1,21%	2,27%	7,20%	0%	12,22%
Totale	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

incrociando i dati delle analisi merceologiche con i dati di raccolta e produzione è stato ricostruita la composizione dei RSU.

Tabella 1-2: composizione dei rifiuti solidi urbani nella provincia FC

frazioni merceologiche	composizione % RSU
carta-cartone	22,8%
plastica-metalli	27,1%
vetro	6,3%
organico	21,2%
Verde	11,8%
RUP	0,3%
altri	10,6%
Totale	100,0%

Anche se questi dati si riferiscono solo ad una particolare provincia forniscono un'indicazione utile ai fini dell'indagine. È possibile quindi affermare che i rifiuti sono composti principalmente da carta e plastica, mentre la terza categoria merceologica per importanza è l'organico. Potenziare e migliorare la raccolta differenziata e il recupero della frazione organica è dunque un importante obiettivo per la riduzione dei rifiuti da smaltire in discarica o all'inceneritore.

1.4 Problematiche di gestione della FORSU (frazione organica da RSU):

Se la sostanza organica intercettata mediante raccolta differenziata (FORSU) contiene delle impurezze di materiali estranei questo può creare dei problemi nella gestione degli impianti di compostaggio in quanto si ritrovano intatti alla fine del processo e vanno ad abbassare la qualità del compost in uscita.

Negli impianti di compostaggio (aerobico o non) si cerca di ridurre il più possibile questi inquinanti sottoponendo tutto il materiale a triturazione e vagliatura prima di procedere con lo smaltimento. L'efficacia di questi pretrattamenti però è limitata e il sottovaglio di inquinanti deve essere smaltito, andando a incidere sui costi di gestione.

Inoltre il compost in uscita per poter essere utilizzato come ammendante in agricoltura deve sottostare per legge a precisi requisiti qualitativi.

Per tutti questi motivi è estremamente importante avere del materiale in ingresso il più possibile esente da inquinanti e materiali non biodegradabili.

Tra i problemi di gestione è da tenere conto anche che, per quanto riguarda i biodigestori anaerobici, utilizzare FORSU come materia prima comporta una variabilità di composizione dei flussi in ingresso, essendo per definizione un rifiuto composto da scarti alimentari soggetto a variazioni stagionali.

Questo si ripercuote sul gas in uscita, che a sua volta avrà delle fluttuazioni in qualità e nelle quantità prodotte.

Questa variabilità rende la gestione dell'impianto più difficoltosa e delicata.

1.5 Composizione chimica delle biomasse trattate:

Dal punto di vista della composizione delle matrici vegetali contenute nelle biomasse di scarto, i maggiori costituenti sono sostanzialmente di tre tipi: carboidrati, lignina e trigliceridi.

I carboidrati a loro volta si possono suddividere a seconda dei polisaccaridi di cui sono composti: amidi, pectine, cellulose e emicellulose.

La lignina è una macromolecola di tipo polimerico costituita da unità fenoliche legate tra loro, presente all'interno della biomassa ligno-cellulosica.

I trigliceridi invece sono molecole costituite da glicerina esterificata con tre molecole di acidi grassi uguali o diversi, più o meno insaturi, con catene di carbonio che contengono principalmente C₁₆, C₁₈ e C₂₀. Le fonti principali di questi trigliceridi sono oli e grassi presenti all'interno di materie prime sia vegetali che animali.

1.5.1 La parete cellulare vegetale :

Le cellule vegetali si differenziano dalle cellule animali per la presenza di una parete cellulare.

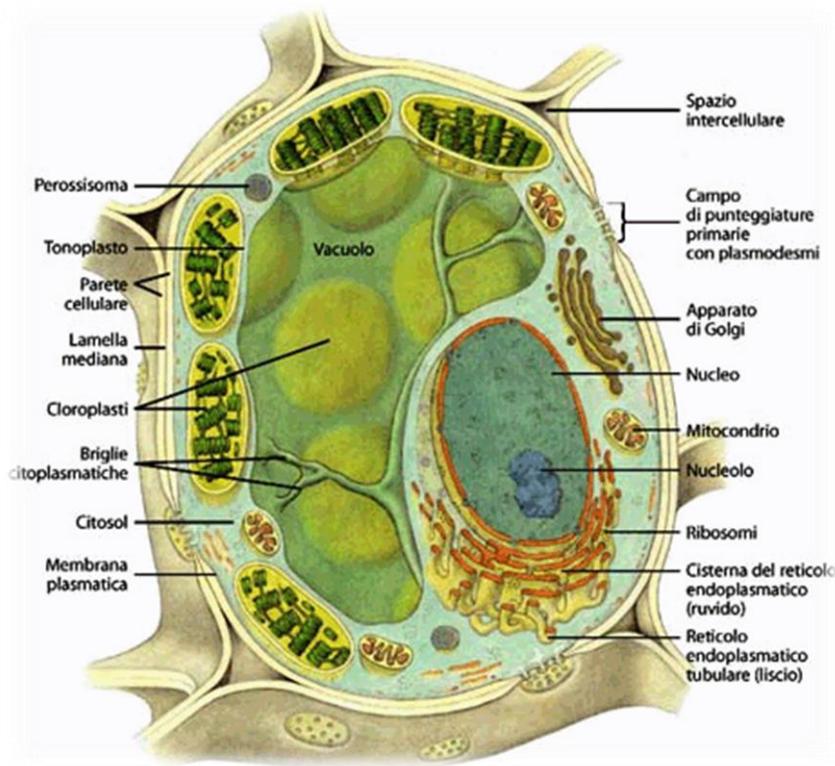


Figura 1-8: rappresentazione di una cellula vegetale vista in sezione³

Queste cellule possono avere varie forme e funzioni, ma tutte sono derivate da cellule indifferenziate che si formano in una regione chiamata meristema. Le cellule meristematiche sono circondate da una matrice semi-solida ricca di polisaccaridi chiamata parete primaria.

La parete cellulare costituisce l'involucro esterno della cellula e adempie a numerose funzioni:

- dà supporto strutturale e meccanico, conferendo alla cellula una determinata forma
- regola la diffusione di materiale attraverso la cellula
- protegge la cellula da agenti patogeni
- controbilancia la pressione interna della cellula
- permette interazioni tra cellula e cellula

La parete primaria è costituita da polisaccaridi (più del 90% della sostanza secca), da piccole quantità di proteine strutturali (glicoproteine, intorno al 2-10%), da

esteri fenolici (<2%), minerali ed enzimi. Il contenuto di acqua può arrivare fino al 70 % del volume totale⁴. Tra i residui glucosidici costituenti i vari polisaccaridi sono presenti zuccheri esosi e pentosi quali glucosio, galattosio, xilosio, arabinosio, rhamnosio, ecc.

I principali polimeri polisaccaridici che costituiscono la parete primaria sono :

- cellulosa
- emicellulosa
- pectina

la cellulosa è un polimero organico formato da un elevato numero di molecole di D-glucosio legate tra loro da un legame β -1,4 glucosidico.

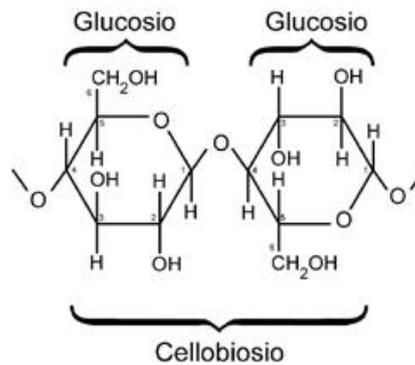


Figura 1-9: struttura del cellobiosio, unità costituente il polimero di cellulosa

I polimeri di cellulosa sono presenti come strutture ordinate, infatti la stereochimica del legame impone alla molecola una configurazione essenzialmente lineare, dove le unità di glucosio rimangono allineate sul piano. In questa configurazione i gruppi ossidrilici della molecola sono rivolti verso l'esterno e possono formare legami di tipo idrogeno con le catene vicine⁵. Si formano così delle zone cristalline composte da più unità polimeriche legate da interazioni elettrostatiche. La presenza di zone cristalline conferisce alla cellulosa resistenza e rigidità strutturale, mentre le zone amorfe ne garantiscono la flessibilità e la rendono meno fragile.

L'emicellulosa è un gruppo di polisaccaridi ramificati di vario tipo, include xiloglucani, xilani, mannani e arabinogalattani. Chimicamente l'emicellulosa viene definita come la parte della parete cellulare che viene solubilizzata mediante l'uso di sostanze fortemente alcaline.

Xilani e xiloglucani sono i polisaccaridi maggiormente presenti nell'emicellulosa.

Lo xilano è formato da una catena di molecole di D-xilosio legate tra loro da un legame β -1,4-glicosidico, nelle quali possono essere presenti dei sostituenti laterali di L-arabinosio, D-galattosio, ecc⁶. Lo xiloglucano invece è composto da una catena principale di glucosio legato β -1,4 dalla quale partono diverse catene laterali di xilano, le quali a loro volta possono presentare dei sostituenti laterali di zuccheri diversi. La catena principale presenta ramificazioni per più del 75%.

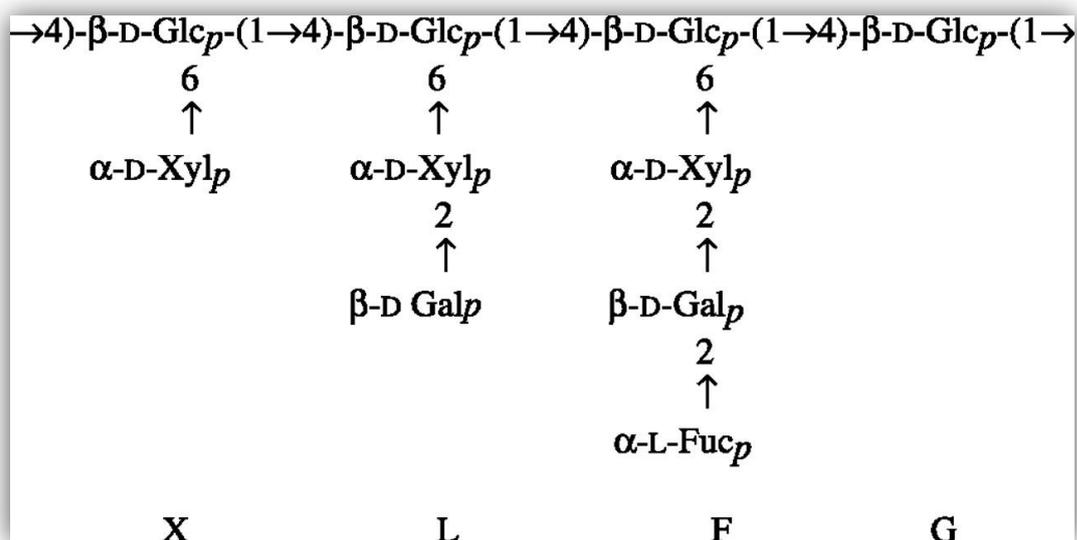


Figura 1-10: struttura dello xiloglucano⁷

La somiglianza strutturale tra cellulosa e emicellulosa probabilmente è responsabile delle forti interazioni non covalenti che si instaurano tra le due molecole, rendendo la parete cellulare più forte e resistente.

Le pectine sono un altro importante gruppo di polisaccaridi eterogenei, sono formate da unità di acido D-(+)-galatturonico legate tra loro da un legame α -1,4-glicosidico. L'acido galatturonico è una molecola simile al glucosio, differisce

soltanto per la presenza in posizione 6 di un $-\text{COOH}$ al posto del gruppo alcolico ($-\text{CH}_2\text{OH}$). Il gruppo carbossilico può essere esterificato con un metile, a seconda del grado di metilazione si parla di acidi peptici ($<6\%$) o di pectine ($>6\%$). Le pectine presenti in natura in genere hanno un grado di metilazione del 70% o più. Sullo scheletro di acido galatturonico si inseriscono diverse catene laterali, costituite principalmente da D-galattosio e L-arabinosio, alle quali possono essere legate anche altre molecole (ad esempio L-ramnosio e acido ferulico)⁸. Le pectine non hanno una funzione strutturale all'interno delle cellule vegetali, ma creano interazioni tra cellulose e xilani fungendo da "collante" della matrice vegetale.

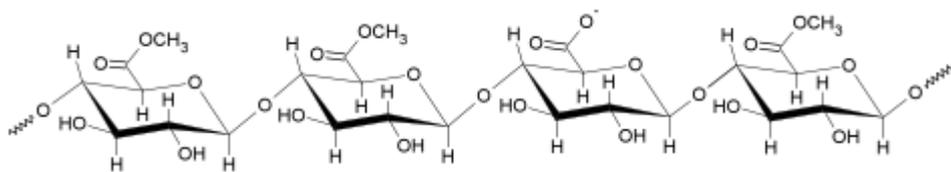


Figura 1-11: polimero di acido galatturonico in una pectina⁹.

1.5.1.1 Differenze tra monocotiledoni e dicotiledoni

I vegetali possono essere suddivisi in due grandi famiglie: monocotiledoni e dicotiledoni. Tra le specie monocotiledoni più importanti si ricordano: riso, grano, frumento, mais, cipolla, aglio e bamboo. Fanno invece parte delle dicotiledoni molte piante tra cui melo, pero, pesco, albicocco, ciliegio e pomodoro.

La parete cellulare presenta delle differenze di composizione a seconda della specie vegetale a cui appartiene.

È possibile distinguere due tipi di parete cellulare primaria:

- Tipo 1: presente in tutte le piante dicotiledoni e nelle monocotiledoni non commelinoidi; oltre alla cellulosa è composta principalmente da xiloglucano e contiene un 20-35% di pectina.
- Tipo 2: tipica delle monocotiledoni commelinoidi (es: graminacee); presenta un basso contenuto di pectina ($<10\%$) e il principale polimero polisaccaridico non cellulosico è il glucuronoarabinosilano¹⁰.

1.5.1.2 La struttura della parete cellulare

La parete cellulare ha una struttura molto complessa; attualmente il modello più accreditato suggerisce la presenza di interazioni non covalenti tra i vari polimeri polisaccaridici, con la formazione di due reticoli distinti collegati tra loro.

È possibile quindi distinguere i reticoli, uno formato da polimeri peptici e l'altro costituito da cellulosa e xiloglucano (Figura 1-12).

Il reticolo tra cellulosa e xiloglucano è la principale struttura portante presente nella parete cellulare e conferisce resistenza alla struttura. Le molecole di xiloglucano si legano alla superficie delle microfibrille di cellulosa, fissandole le une con le altre, migliorandone così le proprietà meccaniche.

Le pectine invece non hanno funzione strutturale, ma piuttosto una funzione di riempimento, formano un gel nel quale viene incorporato il reticolo cellulosa-emicellulosa, che previene l'aggregazione e il collasso della struttura¹¹. Le pectine inoltre regolano la porosità della parete cellulare e legano elettrostaticamente molecole cariche positivamente quali enzimi, impedendone la diffusione in siti inappropriati.

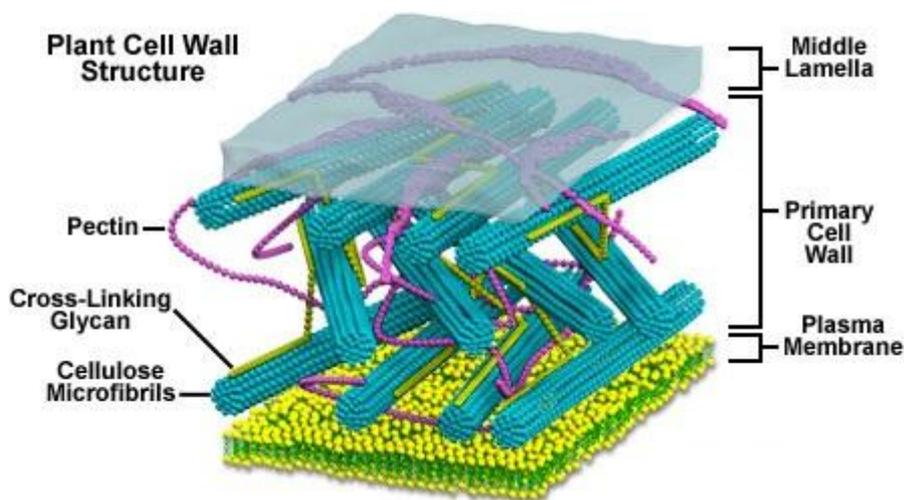


Figura 1-12: struttura della parete cellulare¹²

1.6 Biocatalizzatori per l'idrolisi dei tessuti vegetali:

I più importanti biocatalizzatori presenti in natura sono gli enzimi. Essi rivestono una grande importanza a livello biologico in quanto permettono l'espletamento di reazioni chimiche anche complesse con condizioni ambientali blande: bassa temperatura e pressione atmosferica. Gli enzimi infatti agiscono abbassando l'energia di attivazione, permettendo lo svolgimento rapido della reazione.

Il principale elemento distintivo che li caratterizza è la specificità, essi infatti sono in grado di catalizzare solo determinati tipi di reazioni, a differenza dei catalizzatori inorganici che possono essere impiegati in diverse situazioni.

I più importanti enzimi idrolitici che agiscono sui tessuti vegetali sono:

- Cellulasi
- Xilanasi
- Pectinasi
- Amilasi

1.6.1 Cellulasi:

Gli enzimi in grado di destrutturare la cellulosa in unità più semplici vengono chiamati cellulasi, essi sono in grado di idrolizzare il legame β -1,4 glucosidico tra le molecole di glucosio di cui è formata la catena polimerica. Trovano vasti campi di applicazione industriale, tra cui l'utilizzo in cartiere e nel settore tessile.

Le cellulasi possono essere di diverse tipologie:

- Endocellulasi: idrolizzano i legami dentro la catena
- Esocellulasi: rompono i legami dei terminali di catena formando dimeri o oligomeri di poche unità
- Cellobiasi e β -glucosidasi: scindono il legame β -1,4 glucosidico liberando molecole di glucosio.

Tra queste le endo-cellulasi sono quelle col maggior effetto destrutturante e disgregante.

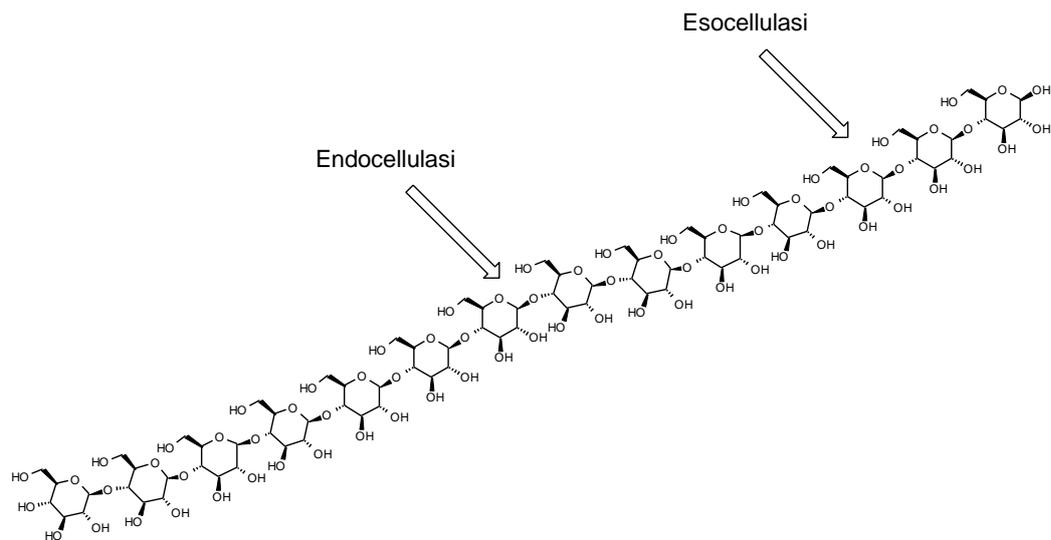


Figura 1-13: zone di attacco dell'endo- ed eso-cellulasi su un polimero di cellulosa¹⁴

1.6.2 Xilanasi:

Tra gli enzimi coinvolti nel processo di idrolisi delle emicellulose le xilanasi sono una classe molto importante. Sono generalmente prodotti da funghi e muffe e sono molto importanti in diverse applicazioni come coadiuvanti delle cellulasi o in altri processi industriali.

Le xilanasi scindono il legame β -1,4-glucosidico tra due molecole di xilosio in posizioni qualsiasi lungo la catena polimerica, sono quindi degli – endo enzimi¹³.

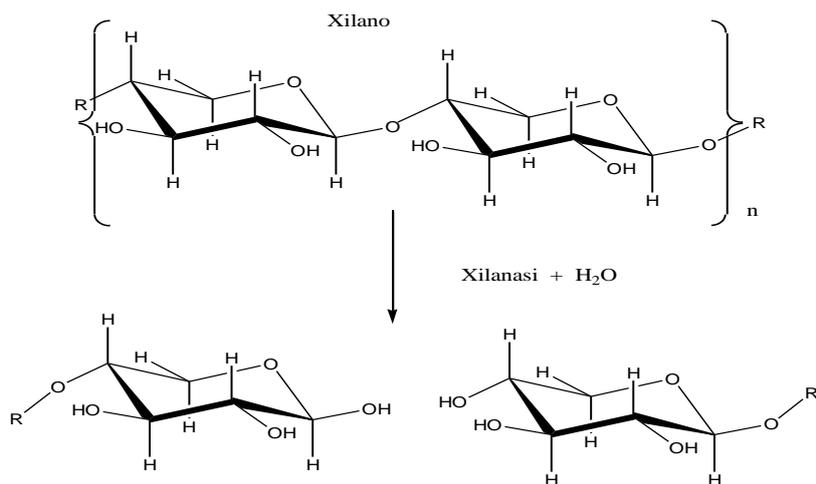


Figura 1-14: idrolisi dello xilano catalizzata da xilanasi¹⁴

1.6.3 Pectinasi:

Le pectinasi sono tra i biocatalizzatori più largamente impiegati in applicazioni industriali, specialmente nei settori di produzione di succhi di frutta e trasformazione degli alimenti.

Essi sono in grado di destrutturare la complessa struttura poligalatturonica presente nelle pareti vegetali.

Durante degradazione della sostanza organica vegetale l'attività pectinasi gioca un ruolo molto importante nella fase iniziale della destrutturazione e il suo valore sarà limitante sull'azione degli altri enzimi.

Gli enzimi in grado di destrutturare la pectina possono essere di diversi tipi (Figura 1-15):

- Pectin-esterasi: rimuovono una molecola di metanolo dal gruppo carbossilico esterificato, procedendo lungo la catena. In questo modo si formano blocchi di acido galatturonico non esterificato lungo il polimero.
- Poligalatturonasi (o pectinasi): sono endo enzimi che degradano i polimeri di acido galatturonico in oligomeri. Agiscono preferibilmente su pectine poco metilate o completamente de-esterificate.
- Pectin-Lyase: anch'essi sono endo enzimi ma, a differenza delle poligalatturonasi, agiscono preferibilmente su pectine metilate.
- Pectate-Lyase: in presenza di ioni di calcio idrolizzano il legame α -1,4 nelle pectine poco esterificate, generando oligosaccaridi con residui insaturi in posizione 4,5 all'estremità terminale non riducente¹⁵

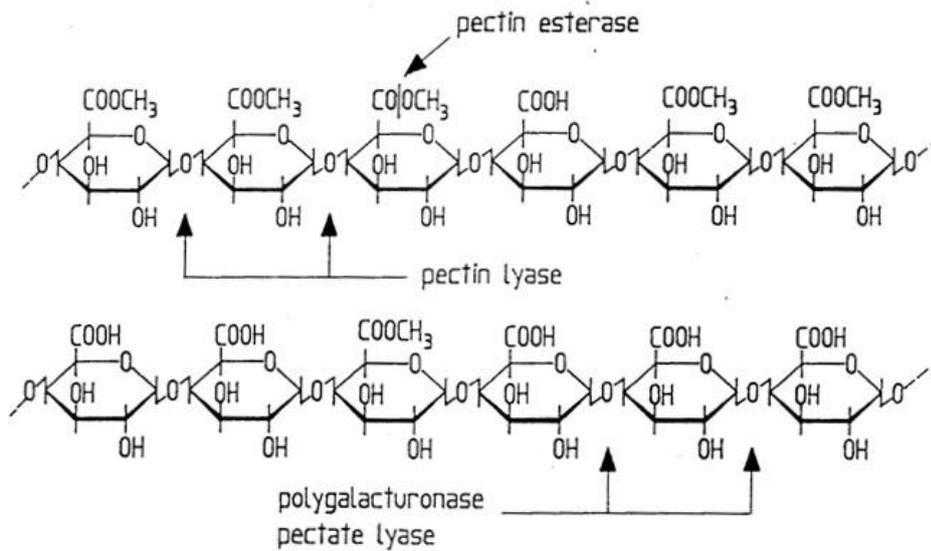


Figura 1-15: Azione di idrolisi dei diversi enzimi pectolitici¹⁴

1.6.4 Amilasi:

l'amido è un'importante riserva di energia per le piante; è formato da una parte solubile, l'amilosio e da una parte insolubile, l'amilopectina.

L'amilosio è circa il 20% del totale, con una percentuale che varia a seconda dell'origine, ed è composto da catene di glucosio unite con un legame α -1,4 glucosidico. Presenta una struttura lineare con configurazione a elica.

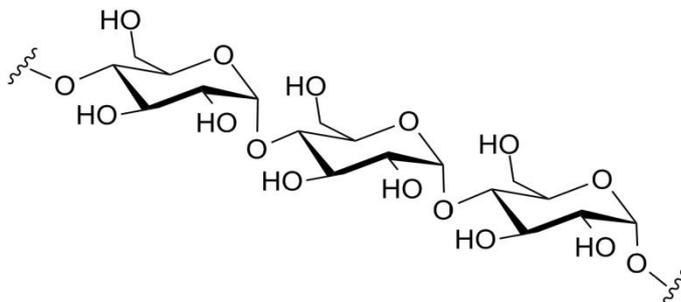


Figura 1-16: struttura dell'amilosio

L'amilopectina invece presenta delle ramificazioni innestate su una catena principale mediante legame α -1,6 glucosidico.

Gli enzimi che degradano l'amido vengono chiamati genericamente amilasi e sono di diversi tipi: le α e β amilasi scindono il legame α -1,4 glucosidico formando oligomeri (malto destrine); le isoamilasi invece idrolizzano il legame α -

1,6 glucosidico delle catene laterali. Infine troviamo le amiloglucosidasi che agiscono su oligomeri a basso peso molecolare per liberare molecole di glucosio. Le α e β amilasi sono molto importanti perché riducono il peso molecolare dell'amido ma vengono inibite da elevate concentrazioni di malto destrine, sono soggette cioè ad inibizione feed-back.

Le attività enzimatiche descritte sono naturalmente possedute dalle popolazioni che si sviluppano all'interno dei rifiuti in ambiente aerobico. Quando ci si trova in ambiente anaerobico lo sviluppo di biomassa attiva è più lento e di conseguenza anche il processo di idrolisi viene rallentato.

1.7 La fermentazione anaerobica:

Le vie per la degradazione dei composti organici e la conservazione dell'energia in ATP possono essere divise in due grandi gruppi: la fermentazione, nella quale il processo avviene in assenza di ossigeno, e la respirazione. I primi processi metabolici sono comuni a entrambi, prendiamo come esempio il glucosio:

la via metabolica del glucosio si può dividere in tre fasi distinte; la prima consuma due molecole di ATP e porta alla formazione di un intermedio importante: la gliceraldeide-3-fosfato. Questa è una molecola importante perché fa parte anche del metabolismo dei grassi, infatti il glicerolo viene assimilato con la conversione in questo intermedio. Poi si ha una seconda fase dove avviene la reazione di ossidazione: la gliceraldeide-3-P viene ossidata ad acido 1,3-difosfoglicerico, in questo passaggio si producono 2 molecole di NADH (una per ogni gliceraldeide ossidata). Nella terza fase si producono in tutto 4 molecole di ATP nel passaggio da acido 1,3- difosfoglicerico ad acido piruvico. Il bilancio complessivo della glicolisi è quindi di 2 ATP e 2 NADH prodotti per ogni molecola di glucosio consumata.

Nel metabolismo aerobico l'acido piruvico viene progressivamente ossidato attraverso una serie di reazioni cicliche conosciute come il ciclo degli acidi tricarbossilici o ciclo di Krebs. Da questo ciclo si ottengono diverse molecole di NADH, NADPH, $FADH_2$ che devono essere ri-ossidate mediante fosforilazione ossidativa. La funzione della fosforilazione accoppiata con il trasporto degli elettroni è quella di sintetizzare ATP.

Nel metabolismo anaerobico questo non avviene, qui l'acido piruvico va incontro al processo di fermentazione. Esistono vari tipi di fermentazione, ma hanno in comune la caratteristica di mettere in atto solo un'ossidazione parziale del substrato, con un rilascio limitato dell'energia potenzialmente disponibile. Inoltre le molecole di NADH, NADPH prodotte non possono più essere ri-ossidate mediante fosforilazione ossidativa ma da un processo chiamato fosforilazione a livello del substrato. Il NAD⁺ viene ripristinato per ossidazione del NADH attraverso reazioni che coinvolgono la riduzione di acido piruvico a vari tipi di prodotti di fermentazione¹⁶. Questo processo rende solo l'8% circa dell'energia che può essere prodotta in ambiente aerobio¹⁷. Per questo motivo in assenza di ossigeno la crescita dei microorganismi è più lenta e necessita di elevate quantità di substrato.

1.8 Lo smaltimento della frazione organica del rifiuto solido urbano (FORSU):

la frazione organica differenziata viene generalmente smaltita all'interno di impianti di compostaggio aerobico nei quali viene controllata, accelerata e migliorata la naturale decomposizione biologica della biomassa. Come prodotto in uscita si ottiene del compost biologicamente stabile, utilizzabile come ammendante per svariati impieghi agronomici.

Tra le altre tecnologie a disposizione si sta sviluppando rapidamente lo smaltimento mediante digestione anaerobica con produzione di biogas. Qui il processo di decomposizione della biomassa avviene in assenza di ossigeno: i microorganismi attaccano la sostanza organica da cui traggono il nutrimento necessario al loro sostentamento, producendo metano e CO₂ come sottoprodotti del metabolismo. Il processo di digestione anaerobica può essere suddiviso in più fasi:

- 1) fase idrolitica
- 2) fase acidogenica
- 3) fase acetogenica
- 4) fase metanogenica

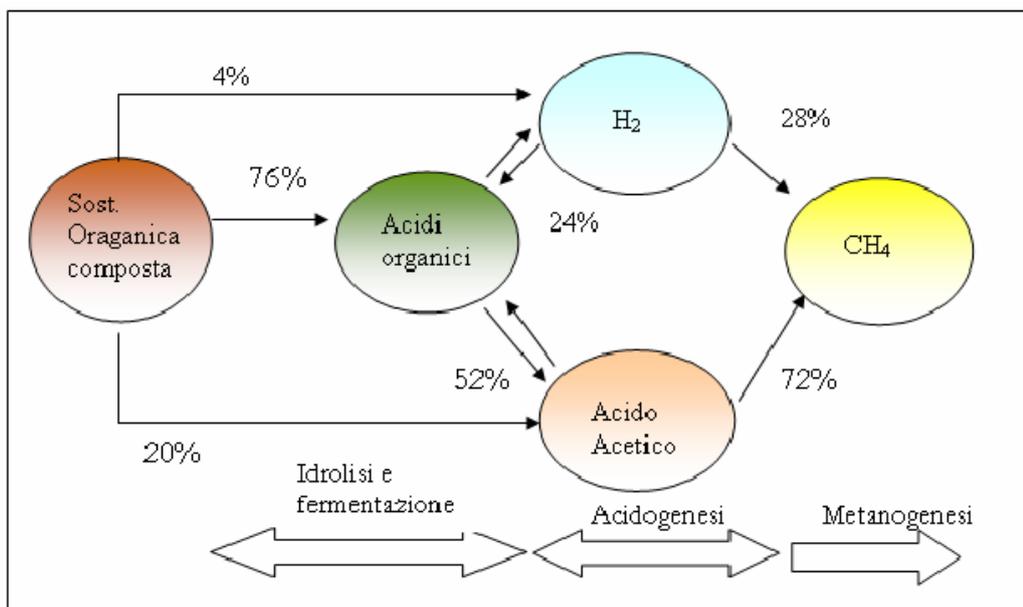


Figura 1-17: schema di flusso quantitativo dei diversi cammini metabolici del processo di digestione anaerobica

si può distinguere inoltre una primissima fase aerobica, dove l'ossigeno presente all'interno del reattore viene completamente consumato per produrre biomassa e CO₂. Insieme all'ossigeno vengono consumati gli zuccheri semplici e le sostanze facilmente fermentescibili; più si prolunga la fase aerobica più si sviluppa biomassa utile per le successive fasi, ma si ha lo svantaggio di "perdere" parte del substrato convertito a CO₂.

1.8.1 Idrolisi:

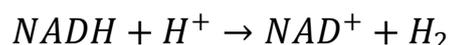
Esaurito l'ossigeno inizia la fase idrolitica vera e propria, i microorganismi presenti all'interno della biomassa rilasciano enzimi in grado di aggredire le macromolecole organiche. Queste si disgregano in unità più semplici che possono essere facilmente metabolizzate e utilizzate nelle fasi successive. Gli enzimi coinvolti nel processo di idrolisi sono specifici per ogni tipologia di matrice presente: per l'idrolisi degli amidi si utilizzeranno le amilasi, per le proteine le proteasi e così via. Essendo la matrice organica a disposizione composta in grande parte da scarti di origine vegetale saranno presenti grandi quantità di cellulosa, emicellulosa e lignina difficili da idrolizzare. L'idrolisi risulta generalmente la fase limitante dell'intero processo.

1.8.2 Acidogenesi:

L'acidogenesi, o fermentazione dei monomeri organici, è generalmente definita come produzione biologica anaerobica di acidi organici in assenza di accettori o donatori di elettroni (Gujer e Zehnder, 1983). In questa fase intervengono i batteri acidogenici che utilizzano parte delle sostanze semplici formatesi nella fase di idrolisi degradandole attraverso processi fermentativi. Come prodotti della fermentazione si ottengono acidi grassi, alcoli, acido acetico e altri acidi organici. In questa fase viene consumato anche tutto l'ossigeno residuo presente come gas disciolto all'interno del percolato, rendendo l'ambiente completamente anaerobico, condizione essenziale per la crescita dei batteri metanigeni.

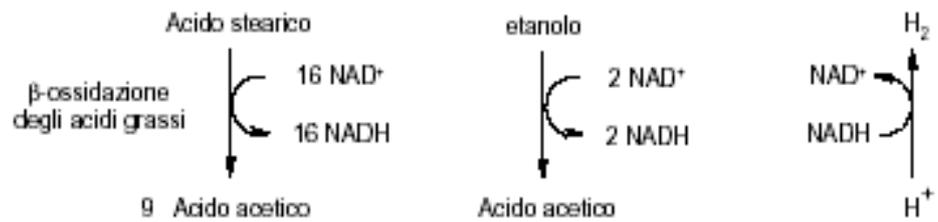
1.8.3 Acetogenesi:

è il processo attraverso il quale gli acidi volatili e alcoli vengono trasformati in acido acetico. Questa trasformazione avviene per opera di batteri acetogenici idrogeno-produttori obbligati. Essi infatti producono acido acetico, CO₂ e idrogeno. È importante osservare che questa loro grande capacità di ossidazione si può realizzare solo perché sono in grado di rigenerare i loro coenzimi ossidati NAD⁺ utilizzando come accettore finale di elettroni lo ione H⁺ che viene ridotto ad H₂ secondo la reazione:



L'etanolo prodotto per fermentazione alcolica ad esempio può essere a sua volta ossidato ad acido acetico ad opera di batteri acetogenici. Il coenzima NAD⁺ subisce una riduzione a NADH, si rende necessario quindi un ciclo di rigenerazione in cui il coenzima, ossidandosi, andrà a ridurre lo ione H⁺ con produzione di idrogeno molecolare.

La fosforilazione a livello del substrato compiuta dai batteri acetogenici dunque può essere così riassunta:



L'accumulo di idrogeno elementare H_2 inibisce la crescita di questi batteri; per questo motivo il loro sviluppo dipende anche dalla presenza dei metanobatteri, che sono in grado di utilizzare H_2 per il loro metabolismo, sottraendolo dal sistema.

1.8.4 Metanogenesi:

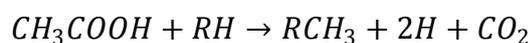
Nella quarta ed ultima fase intervengono i metanobatteri, un gruppo di batteri strettamente anaerobi. È possibile distinguerne di due tipi: i batteri Acetoclasti, che utilizzano acido acetico per produrre metano e CO_2 , e i batteri idrogenofili che producono metano a partire da CO_2 e idrogeno¹⁸.

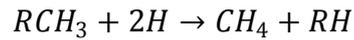
I principali ceppi coinvolti sono: *Methanosarcina*, *Methanothix (acetoclasti)*, *Methanobacterium* e *Methanococcus (idrogenofili)*.

Dal punto di vista nutrizionale sono chemio-lito-eterotrofi, cioè ricavano l'energia necessaria per il loro anabolismo degradando sostanze chimiche (chemiotrofi) e possono utilizzare, per costruire le proprie strutture carboniose, sia la CO_2 , sia molecole organiche (lito-eterotrofi). Sono anaerobi obbligati, cioè la presenza dell'ossigeno elementare per loro è tossica e la loro crescita è totalmente inibita anche solo da tracce di O_2 .

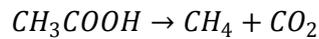
Si hanno dunque due possibili vie metaboliche, a seconda dei microorganismi interessati nella trasformazione.

Una prima via riguarda la formazione del metano per trasformazione del gruppo metilico dei substrati organici a basso peso molecolare (acido acetico) attraverso una reazione di trans-metilazione:

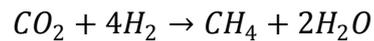




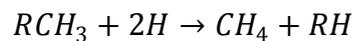
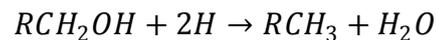
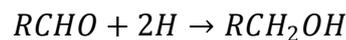
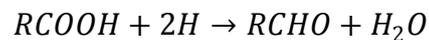
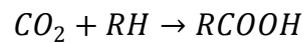
Che può essere sintetizzata con l'espressione:



L'altra via, che prevede la riduzione dell'anidride carbonica molecolare, può essere descritta dalla seguente reazione complessiva:



Che in realtà comprende una serie di reazioni successive:



Le due vie, quella dei batteri idrogenotrofi e quella acetoclastica, non sono equivalenti dal punto di vista di produzione del metano: tende infatti a prevalere il meccanismo di dismutazione anaerobica dell'acido acetico¹⁹.

In questa fase può avvenire anche la produzione di acido solfidrico (H₂S) per opera dei batteri solfato-riduttori, essi infatti competono per il substrato con i metanigeni. Un'elevata presenza di H₂S oltre ad essere tossica per i metano batteri può indicare la prevaricazione dei solfato-riduttori sul comparto menanigero, è quindi un importante indicatore per la corretta gestione dell'impianto.

1.9 L'influenza della temperatura:

La biometanazione può avvenire a diverse temperature, in un range tra i 5 e i 70°C. La popolazione microbica attiva però non è la stessa in ogni condizione ambientale, infatti a seconda della temperatura di esercizio sono presenti diversi tipi di batteri. Questi possono essere classificati a seconda dell' optimum di temperatura in cui vivono, si dividono in:

- psicrofili: con temperatura ottimale di crescita sotto i 20°C
- mesofili: preferiscono temperature comprese tra i 20 e i 45°C
- termofili: con temperatura ottimale sopra i 45°C

la temperatura non influenza soltanto la tipologia delle specie microbiche coinvolte ma anche la velocità delle reazioni presenti.

1.10 le tecnologie disponibili:

lo smaltimento della FORSU mediante fermentazione anaerobica può essere effettuato utilizzando diverse soluzioni impiantistiche.

I diversi tipi di impianto si possono classificare a seconda dei seguenti parametri²⁰:

- Temperatura di esercizio (psicofilia, mesofilia o termofilia)
- Contenuto di solidi nel reattore
 - processo umido (wet), se il contenuto di solidi totali è del 5-8%
 - processo semi-secco (semi-dry), se il contenuto di S.T. è tra l'8 e il 20%
 - processo secco (dry), se il contenuto di S.T. supera il 20%
- Fasi biologiche:
 - Unica: se il processo di fermentazione avviene in un unico reattore
 - Separate: se le fasi di idrolisi e acidogenesi sono divise dalla fase metanogenica
- Tipo di reattore utilizzato:
 - processo continuo (reattore perfettamente miscelato o con flusso a pistone)
 - processo discontinuo (BATCH)

1.10.1 Digestione “wet”:

con il termine digestione wet si indica un tipo di processo di fermentazione anaerobica nel quale la sostanza organica di partenza viene opportunamente trattata e diluita fino a raggiungere un tenore di solidi inferiore al 10%.

Questo tipo di processo è stato il primo ad essere utilizzato nello smaltimento della FORSU, in quanto sfrutta le conoscenze acquisite nel campo della depurazione delle acque.

Solitamente questo tipo di scelta viene effettuata per impianti che utilizzano processi di digestione a fase unica con reattore continuo del tipo perfettamente miscelato (CSTR).

I problemi principali di questo tipo di tecnologia stanno nella difficoltà di miscelazione del rifiuto all'interno del reattore, che provoca anche una riduzione dei tempi di ritenzione rispetto a quelli previsti da progetto, e saltuari fermi impianto per rimuovere la frazione pesante che si deposita sul fondo.

Il vantaggio di utilizzare una tecnologia ben conosciuta e avviata si contrappone con gli elevati costi di investimento per pretrattamenti e dimensioni del reattore.

1.10.2 Digestione “semi-dry”:

questo processo nasce nel corso degli anni '80²¹ e si pone a metà strada rispetto ai processi wet e dry, opera infatti con un contenuto di solidi del 15-20%.

Analogamente al processo wet utilizza un reattore del tipo perfettamente miscelato, con i relativi problemi di separazione di fase, anche se in generale il fenomeno è meno accentuato. Questo tipo di impianto ha il vantaggio di ridurre le dimensioni del reattore ma necessita di utilizzare una materia prima in entrata priva di materiali estranei. Servono pertanto dei pretrattamenti molto spinti, specialmente se il rifiuto non è ben differenziato, con conseguente aumento dei costi di investimento. In seguito ai pretrattamenti il rifiuto può essere diluito con acqua per raggiungere il tenore di solidi desiderato.

La necessità di aumentare i volumi trattati con acqua determina maggiori spese per il riscaldamento del reattore alla temperatura desiderata.

1.10.3 Digestione “dry”:

È possibile effettuare la fermentazione in continuo anche con percentuali di sostanza solida superiori al 20%.

Questi impianti lavorano con rifiuti contenenti S.T. tra il 20 e il 40%, ciò non comporta grandi variazioni nel processo biochimico rispetto ai processi descritti in precedenza ma richiedono cambiamenti significativi nel sistema reattoristico adottato.

A causa delle proprietà reologiche dei flussi trattati (alta densità e viscosità) non è più possibile utilizzare reattori del tipo perfettamente miscelato ma è necessario utilizzare il tipo con flusso parzialmente o totalmente a pistone (plug-flow). Questo tipo di reattori sono più semplici dal punto di vista meccanico ma presentano problemi di miscelazione tra la materia prima in entrata e la biomassa in uscita. Ciò può comportare il mancato inoculo microbico nella sostanza organica entrante con relativi problemi nella fermentazione.

Le soluzioni impiantistiche a questo problema possono essere diverse; le principali tecnologie presenti sul mercato sono:

- processo Dranco: effettua la miscelazione mediante il ricircolo dell'effluente che viene raccolto sul fondo del reattore e pompato nella parte superiore dello stesso.
- Processo Kompogas: utilizza un reattore cilindrico orizzontale munito di miscelatori a lenta rotazione che assistono il movimento della sostanza organica
- Processo Valorga: effettua la miscelazione mediante il ricircolo del biogas, che viene iniettato dal fondo del reattore da una serie di ugelli, che però possono essere soggetti a problemi di intasamento.

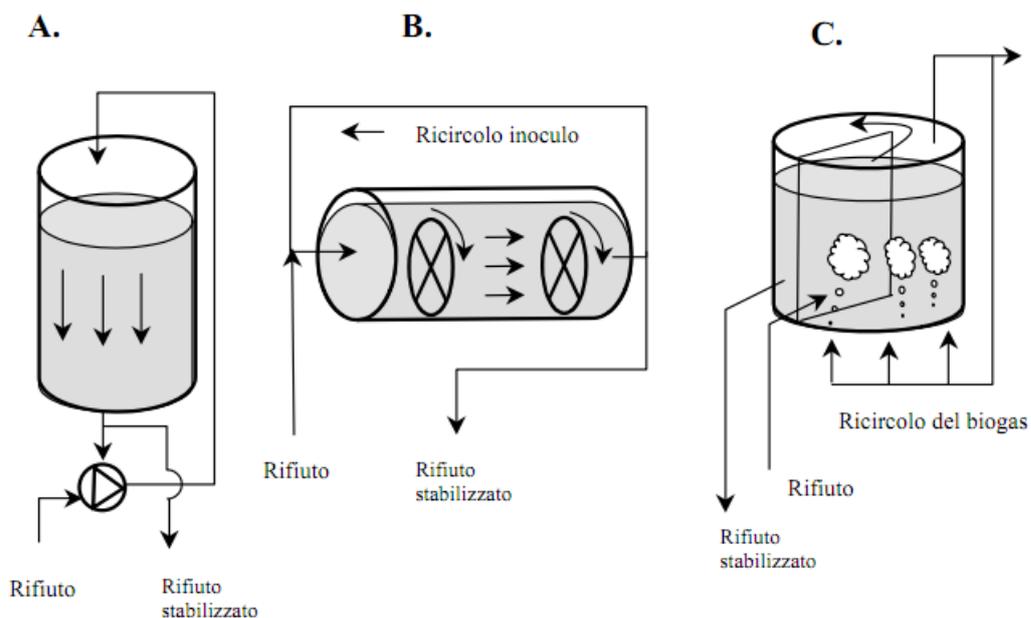


Figura 1-18: differenti tipologie di reattori nei sistemi dry (A = processo dranco, B = Kompostogas, C = Valorga)²²

La fermentazione dry in continuo necessita di elevati costi di investimento iniziali dovuti alla necessità di dotarsi di sistemi di trasporto e pompaggio della sostanza organica che siano particolarmente resistenti e avanzati. Di contro si ha un risparmio nelle dimensioni del reattore, ridotte rispetto ai sistemi wet e semidry descritti in precedenza.

1.10.4 Digestione "Dry" Batch

Con il termine batch viene indicato un processo di tipo discontinuo. Il reattore viene riempito di sostanza organica e lasciato fermentare.

Questo tipo di processo si presta bene ad operare con materiale organico ad elevato contenuto di sostanza solida (in condizioni Dry).

Il rifiuto organico viene caricato all'interno del reattore insieme ad un eventuale inoculo per favorire un adeguato sviluppo batterico. Il percolato prodotto viene raccolto nel fondo del reattore e ricircolato in testa allo stesso, irrorando la massa di rifiuti dall'alto (Figura 1-19).

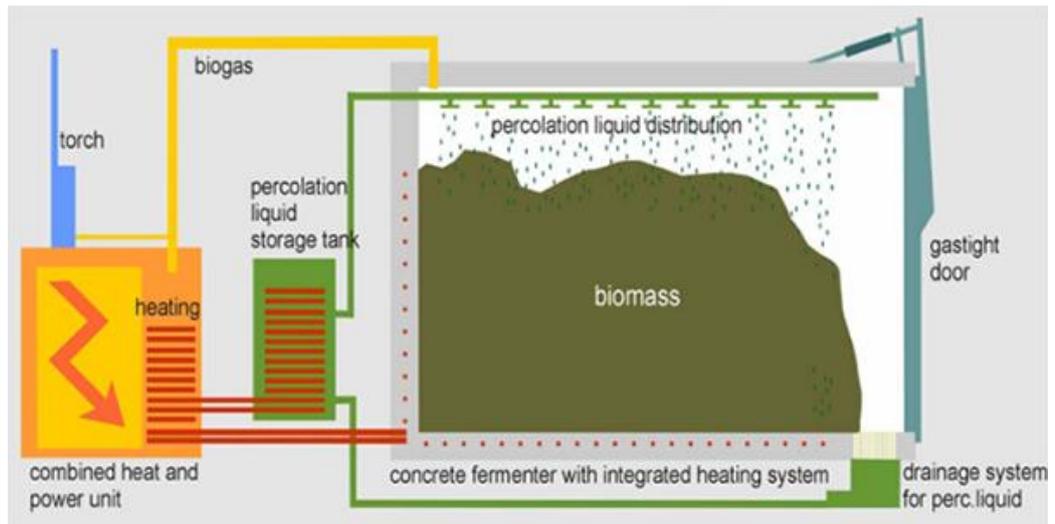


Figura 1-19: possibile configurazione impiantistica di un reattore dry-batch²³

La temperatura di esercizio viene regolata dal sistema di riscaldamento posto all'interno della parete del reattore. La sostanza organica viene fatta così fermentare per diverso tempo, al termine del quale viene rimossa dal reattore. Prima di essere venduta come compost può essere necessario un'ulteriore stabilizzazione aerobica.

Questo tipo di processo ha il vantaggio di essere semplice ed economico, ma necessita di elevate superfici di impianto (confrontabili con il compostaggio)

2 MATERIALI E METODI:

2.1 Preparazione del reagente ADNS (acido 3,5-dinitrosalicilico):

Il saggio per la determinazione degli zuccheri riducenti necessita della preparazione di una soluzione di acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS) che dovrà essere usata come reagente.

In un matraccio da 500 ml si inseriscono 150 g di Sodio Potassio Tartrato, 100 ml di soluzione di idrossido di sodio 2M e 200 ml di acqua distillata. Si aggiungono quindi 0,5 g di acido 2,3-dinitrosalicilico e si lascia sotto agitazione magnetica per tutta la notte per consentire la completa solubilizzazione dei composti.

IMPORTANTE: non scaldare e non utilizzare ultrasuoni per facilitare la solubilizzazione dei composti; l'ADNS è fotosensibile, è opportuno ricoprire il matraccio con carta stagnola per impedire alla luce di degradare il reagente durante le fasi di preparazione.

Una volta solubilizzati tutti i composti si rimuove l'ancoretta magnetica dal matraccio e si porta a volume con acqua distillata. L'ADNS così preparata deve essere conservata in frigorifero, al riparo dalla luce.

2.2 Saggio per la determinazione degli zuccheri riducenti:

Per determinare l'azione di idrolisi degli enzimi su carboidrati complessi si è andati a determinare la concentrazione di zuccheri rilasciati in soluzione.

La procedura è basata sul metodo di Bailey *et al*²⁴ e consente la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti liberati tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS).

Prima di procedere nell'esecuzione del saggio è necessario costruire la retta di taratura. Si sono costruite 3 diverse rette di taratura, una usando come substrato il glucosio, lo xilosio e l'acido D-(+)-galatturonico (vedi **Errore. L'origine riferimento on è stata trovata.**, Figura 2-2 e Figura 2-3).

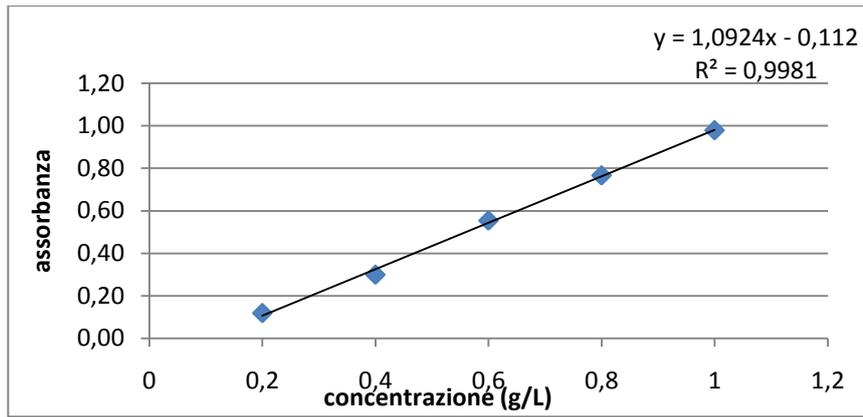


Figura 2-1: retta di taratura per il glucosio

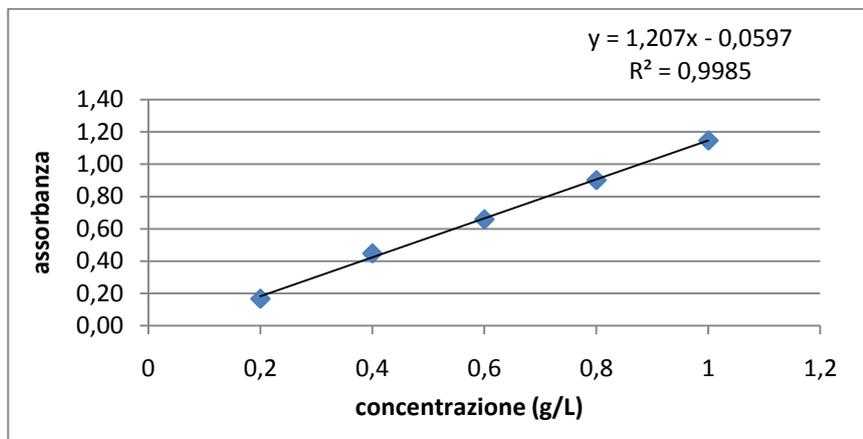


Figura 2-2: retta di taratura per xilosio

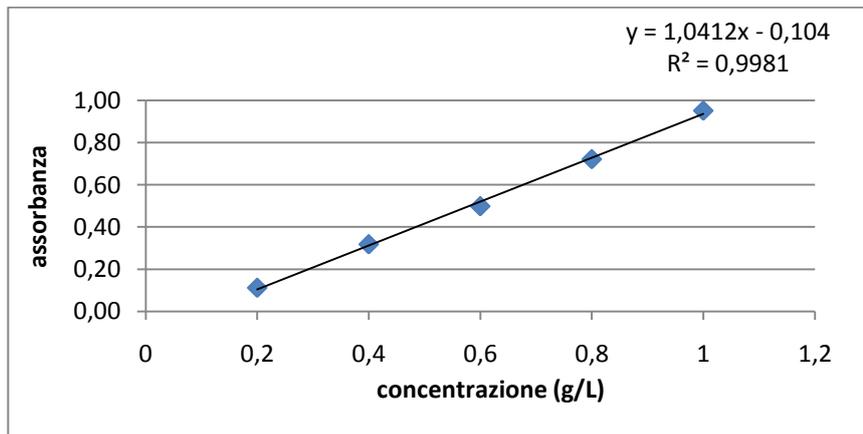


Figura 2-3: retta di taratura per l'acido galatturonico

La realizzazione della retta di taratura prevede la preparazione di più soluzioni standard di ogni substrato a diverse concentrazioni note; queste soluzioni vengono poi sottoposte al saggio con ADNS. Quest'ultimo prevede l'aggiunta di 400 µl di soluzione da analizzare a 600 µl di ADNS all'interno di un heppendorf. Il

campione viene poi posto in acqua bollente per sette minuti, centrifugato per 5 minuti e poi analizzato allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 550 nm. Nel bianco di riferimento si utilizzano 400 µl di acqua distillata al posto della soluzione standard.

La retta di taratura si costruisce interpolando i valori di assorbanza ottenuti contro concentrazione della soluzione analizzata.

L'ADNS (di colore giallo) reagisce con lo zucchero, ossidandolo, mentre nell'acido si ha la riduzione di un gruppo -nitro ad un gruppo -ammino. il composto così formato ha un colore rosso-bruno rilevabile allo spettrofotometro.

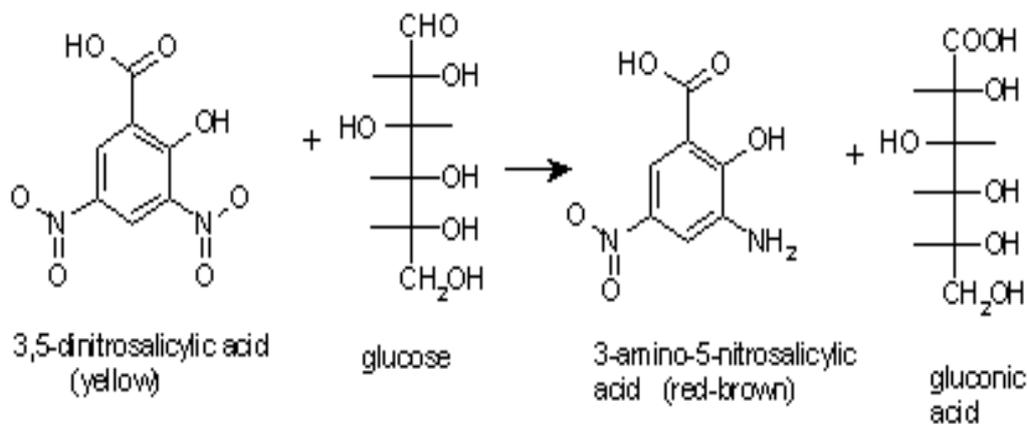


Figura 2-4: reazione di ossidazione del glucosio ad opera dell'acido 3,5-dinitrosalicinico (ADNS)

2.3 Determinazione dell'attività amilasica:

Substrato: si prepara una soluzione di amido all' 1% (p/v) in tampone Mc Ilvaine a pH 5. Per favorire la solubilizzazione del polimero si porta la soluzione a 80°C sotto agitazione magnetica per 10 minuti. Dopo aver lasciato raffreddare la soluzione fino a temperatura ambiente è possibile eseguire il saggio di attività dell'enzima.

Saggio: si pongono 5,4 ml di substrato in una provetta di vetro a cui vengono aggiunti 0,6 ml di soluzione enzimatica. Il tutto viene posto in un bagno termostato a 37°C. Dopo 3 minuti si preleva un aliquota di campione di 0,4 ml e si aggiunge in heppendorf a 0,6 ml di ADNS per la determinazione degli zuccheri (metodica descritta sopra). Se il campione risulta troppo concentrato è

possibile diluirlo prima del saggio con ADNS. Il bianco si realizza aggiungendo a 0,6ml di ADNS 0,4 ml di substrato.

La concentrazione di glucosio rilasciata in soluzione si ottiene inserendo il valore di assorbanza ottenuto all'interno della relativa equazione della retta di taratura realizzata in precedenza. Dalla concentrazione di glucosio è possibile risalire all'attività enzimatica specifica espressa come μmol di monomero rilasciato al minuto, secondo la seguente formula:

$$\text{Attività enzimatica} = \left[\frac{\text{concentrazione di monomero (mmol/ml)}}{\text{min reazione}} \right] * 1000.$$

2.4 Determinazione dell'attività xilanasica:

Substrato: si prepara una soluzione di xilano all'1% (p/v) in tampone Mc Ilvaine a pH 5. Per favorire la solubilizzazione del polimero si porta la soluzione a 80°C sotto agitazione magnetica per 10 minuti. Dopo aver lasciato raffreddare la soluzione fino a temperatura ambiente è possibile eseguire il saggio di attività dell'enzima.

Saggio: si utilizza la stessa metodica descritta per la determinazione dell'attività amilasica.

2.5 Determinazione dell'attività pectinasi:

Substrato: si prepara una soluzione allo 0,3% (p/v) di pectina di mela in tampone Mc Ilvaine a pH 5. Per favorire la solubilizzazione del polimero si porta la soluzione a 80°C sotto agitazione magnetica per 10 minuti. Dopo aver lasciato raffreddare la soluzione fino a temperatura ambiente è possibile eseguire il saggio di attività dell'enzima.

Saggio: si utilizza la stessa metodica descritta per la determinazione dell'attività amilasica.

2.6 Analisi di attività enzimatica su alimenti:

Campione: in una beuta da 50 ml si pongono 2 grammi dell'alimento da sottoporre ad analisi sminuzzato grossolanamente, 18 ml di tampone Mc Ilvaine a pH 5 e 2 ml di soluzione enzimatica diluita 1:100.

Bianco: sempre in una beuta da 50 ml si pongono 2 grammi dell'alimento da analizzare e 20 ml di tampone Mc Ilvaine a pH 5.

Le due beute vengono riscaldate a 50°C su piastra, la temperatura si controlla con un termometro posto all'interno della beuta contenente il bianco. L'agitazione viene effettuata manualmente ad intervalli regolari.

Si effettuano diversi prelievi dall'ambiente di reazione a tempo zero, dopo mezzora, un'ora, due ore e così via fino ad un massimo di 5-6 ore.

L'aliquota prelevata viene sottoposta al saggio per la determinazione degli zuccheri riducenti con ADNS. L'analisi viene fatta in doppio. La concentrazione di zuccheri si ricava dalla retta di taratura del glucosio.

In questo modo è possibile vedere l'azione dell'enzima su un substrato alimentare, confrontandolo con un bianco senza enzima.

2.7 Analisi di attività enzimatica su campione di FORSU:

Campione: si mantengono le stesse proporzioni di substrato-enzima-tampone del saggio di attività su alimenti. In questo caso in una beuta da 250 ml si pongono 15 g di FORSU da sottoporre ad analisi, 135 ml di tampone Mc Ilvaine a pH 5 e 15 ml di soluzione enzimatica diluita 1:100.

Bianco: preparazione analoga a quella del campione, ma al posto di 15 ml di soluzione enzimatica, si aggiungono 15 ml di tampone, per un totale di 150 ml di tampone Mc Ilvaine a pH 5.

Si effettuano diversi prelievi dall'ambiente di reazione a tempo zero, dopo mezzora, un'ora, due ore e così via fino ad un massimo di 5-6 ore.

L'aliquota prelevata viene sottoposta al saggio per la determinazione degli zuccheri riducenti con ADNS. L'analisi viene fatta in doppio. La concentrazione di zuccheri si ricava dalla retta di taratura del glucosio.

2.8 Determinazione degli acidi grassi totali mediante saggio colorimetrico:

La procedura si basa sul metodo di Lowry and Tinsley²⁵ modificato.

Si prepara una soluzione acquosa di acetato di rame (II) al 5% p/v e la si pone sotto agitazione magnetica con piastra riscaldante termostata a temperatura di 30° C per facilitare la dissoluzione del reagente.

Si procede basificando la soluzione con piridina fino a $\text{pH} \cong 6.1$.

Questa soluzione verrà utilizzata come reagente colorimetrico: si aggiunge con una proporzione di 1 a 5 alla soluzione organica contenente gli acidi grassi da determinare. Il rame forma un complesso di colore blu con l'acido grasso, rilevabile allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 715 nm. Il complesso si forma in fase organica.

La presenza di piridina è fondamentale per due motivi: Presenta la capacità di prevenire aggregati micellari di 40 o più unità di complesso Cu-acido grasso, che limiterebbero il trasferimento degli stessi nella fase organica. Inoltre è sospettata di spostare l'acqua di idratazione degli ioni rame del complesso, aumentandone la solubilità nella fase apolare. Di conseguenza, con l'utilizzo di piridina aumenta la sensibilità dell'analisi²⁶.

Per la quantificazione degli acidi grassi presenti è necessario costruire prima una retta di taratura con soluzioni a concentrazioni note.

2.8.1 Costruzione della retta di taratura:

Si prepara una soluzione madre di acido miristico (PM: 228,38) in toluene $2,8 \cdot 10^{-3}$ M. Da questa si preparano diverse soluzioni a concentrazioni note:

- a) $0,35 \cdot 10^{-2}$ M (soluzione madre diluita 1:8)
- b) $0,28 \cdot 10^{-2}$ M (soluzione madre diluita 1:10)
- c) $0,175 \cdot 10^{-2}$ M (soluzione madre diluita 1:16)
- d) $0,14 \cdot 10^{-2}$ M (soluzione madre diluita 1:20)
- e) $0,87 \cdot 10^{-3}$ M (soluzione madre diluita 1:32)

Si pongono in una Falcon sterile da 15 ml 5 ml della soluzione di acido miristico da analizzare e 1 ml di soluzione di acetato di rame.

Il bianco viene preparato mettendo 5 ml di toluene puro al posto della soluzione di acido. Le provette vengono agitate mediante vortex per 3 minuti.

Si ottiene un sistema bifasico, è quindi necessario procedere con una centrifugazione del campione a 2000 giri/min per 3 minuti per migliorare la separazione delle fasi.

Si preleva quindi un aliquota della fase organica sovrastante e se ne misura l'assorbanza allo spettrofotometro a $\lambda_{\max} = 715 \text{ nm}$.

NOTA: si utilizzano falcon sterili per la loro maggiore capacità di tenuta del tappo a vite, con falcon normali durante l'agitazione con vortex si ha una fuoriuscita di liquido.

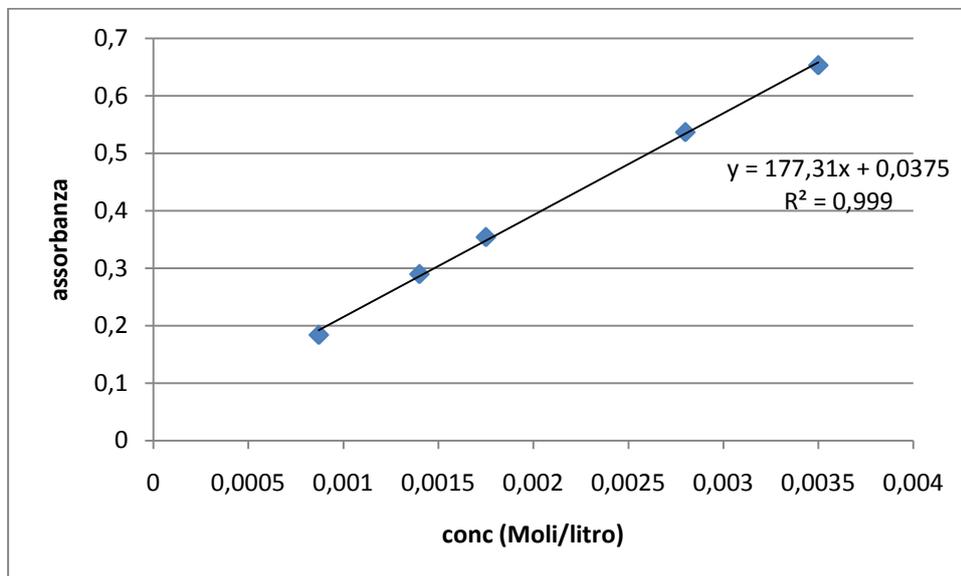


Figura 2-5: retta di taratura per la determinazione degli acidi grassi totali.

2.9 Saggio per la determinazione dell'attività lipasica:

il saggio utilizzato è quello riportato in una tesi precedente²⁷, leggermente modificato rispetto a quello originale di Lowry. Prevede l'utilizzo di :

- Una soluzione di metil miristato 0,7 M in toluene come substrato (0,5 ml)
- Tampone fosfato 20 mM a pH 8 (2 ml)
- Soluzione acquosa di enzima diluito 1:100 (3 ml)

I campioni così preparati vengono posti in agitatore orbitale e termostatati a 30°C.

A vari tempi si prelevano aliquote di 1 ml nelle quali la reazione di idrolisi viene bloccata aggiungendo 0,1 ml di acido solforico 0,1 N.

Successivamente si effettua l'estrazione degli acidi grassi con 3 ml di toluene, agitando per 3 minuti mediante vortex.

Un aliquota di 2 ml della fase organica viene prelevata e sottoposta al saggio colorimetrico per la determinazione degli acidi grassi.

Saggio per la determinazione dell'attività lipasica messo a punto in questa tesi:

durante il lavoro di tesi è stato necessario modificare e mettere a punto un nuovo metodo per la determinazione dell'attività lipasica.

La nuova metodica prevede l'utilizzo di:

- Soluzione di metil miristato in dimetilformammide 0,7M come substrato
- Tampone fosfato 20 mM a pH 8
- Soluzione acquosa di enzima diluito 1:100

Per determinare l'attività lipasica è necessario allestire l'ambiente di reazione: in una falcon sterile da 15 ml si inseriscono 0,5 ml di soluzione di acido miristico, 2 ml di soluzione tampone e 3 ml di soluzione enzimatica.

Come controllo si prepara un'altra provetta analoga ma con 3 ml di acqua distillata al posto della soluzione enzimatica.

I campioni così preparati vengono agitati in termoshaker alla temperatura di 30°C.

Non essendo possibile eseguire più prelievi dallo stesso ambiente di reazione è necessario preparare un ambiente di reazione e un bianco per ogni misurazione che si intende compiere nel tempo.

Ad esempio, per conoscere il rilascio di acidi grassi a tempo zero, dopo mezzora e dopo un ora si devono preparare in contemporanea tre provette identiche contenenti enzima e tre provette identiche senza enzima. Nel momento in cui si inserisce la soluzione enzimatica nelle provette si fa partire il cronometro. La

prima provetta (sia reazione che bianco) verrà analizzata subito mentre le altre verranno esaminate allo scadere del tempo stabilito.

Allo scadere del tempo stabilito si aggiungono nella falcon 0,1 ml di acido solforico 1 N per fermare la reazione e 5 ml di toluene per l'estrazione degli acidi grassi.

Si agita mediante vortex per 3 minuti, al termine dei quali la provetta viene centrifugata per 2 minuti a 2000 giri/minuto per facilitare la separazione di fase.

Si prelevano quindi 2 ml della soluzione organica surnatante e si aggiungono a 0,4 ml di soluzione di rame acetato, come previsto nel saggio per la determinazione degli acidi grassi totali.

L'attività lipasica si ottiene riportando in grafico i dati di concentrazione di grassi nel tempo.

3 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa ricerca è quello di approfondire gli aspetti della valorizzazione dei rifiuti solidi urbani (RSU) all'interno di uno scenario sempre più attento alla tutela dell'ambiente e al recupero energetico.

All'interno dei rifiuti (RSU) si ritrovano diverse tipologie di materiali, tra cui carta, plastica, vetro e composti biodegradabili. Tra queste la frazione organica umida dei rifiuti presenta un potere calorifico basso per l'elevato tenore d'acqua, e non è perciò idonea alla termovalorizzazione.

Le principali tecnologie a disposizione per il riciclo della frazione organica differenziata sono il compostaggio e la biotrasformazione anaerobica con produzione di biogas.

Il compostaggio è un processo in cui viene controllata, accelerata e migliorata la naturale decomposizione biologica della biomassa in ambiente aerobico. Si produce un ammendante organico che può essere utilizzato in agricoltura o nei vivai. La richiesta di compost però non è cresciuta di pari passo con l'offerta, creando una situazione di stallo del mercato.

In un'ottica di maggior richiesta di energia da fonti rinnovabili, lo smaltimento in impianti che sfruttano la fermentazione anaerobica della sostanza organica assume, invece, sempre maggiore interesse economico, politico ed ambientale.

La biometanazione è un processo che si svolge in più fasi ad opera di diversi ceppi microbici, ognuno dei quali richiede condizioni ambientali diverse per svilupparsi.

La fase idrolitica costituisce il primo step per qualsiasi biotrasformazione delle matrici vegetali e rappresenta il fattore limitante nel processo di biometanazione, in quanto i microrganismi metanigeri operanti in ambiente anaerobico non sono in grado di produrre enzimi idrolitici extracellulari.

In natura infatti il processo di idrolisi è prevalentemente a carico di specie batteriche e fungine aerobiche che sono in grado di secernere carboidrati, lipasi e proteasi extra cellulari.

Tutti i processi fermentativi per la produzione di biometano richiedono una fase idrolitica propedeutica alla produzione di zuccheri semplici, acidi grassi e pectidi adatti ad essere fermentati dalla flora metanigena.

La fase idrolitica richiede quindi un ambiente anaerobio o microaerofilo in grado di far sviluppare i microrganismi preposti alla fase idrolitica.

Questo limita fortemente la resa del processo poiché comporta perdita di sostanza organica per ossidazione di substrati a CO₂, altrimenti convertibili a metano, e ritarda l'innesco delle fasi successive allungando i tempi di permanenza nel fermentatore.

Lo scopo di questo elaborato è quello di ottimizzare il processo idrolitico attraverso l'uso di preparati enzimatici commerciali anche in condizioni anaerobiche.

L'attività di laboratorio non si addice all'utilizzo diretto della FORSU a causa di problemi logistici ma soprattutto a causa di problemi riguardanti l'omogeneità e riproducibilità del substrato. Per questo motivo la prima parte del lavoro di tesi sarà focalizzato sull'analisi e lo sviluppo di un modello di rifiuto rappresentativo della frazione organica umida attraverso ricerche bibliografiche ed elaborazioni di dati di composizione merceologica dei rifiuti e di consumi alimentari.

La seconda parte del lavoro consiste nello studio di due tipi di pretrattamenti enzimatici, uno su matrici grasse e oleose mediante l'utilizzo di lipasi e l'altro su matrici ligno-cellulosiche mediante l'impiego di appositi enzimi commerciali.

Lo studio sui pretrattamenti enzimatici prevede una prima fase di caratterizzazione dei preparati commerciali utilizzati, seguita da una seconda

fase in cui si testa l'azione degli stessi su singoli substrati, alimentari e non, presenti all'interno della frazione organica dei rifiuti.

L'azione enzimatica verrà poi verificata su un campione modello di FORSU

L'ultima parte del lavoro sarà focalizzata ad orientare questo lavoro di tesi verso un contesto industriale grazie alla collaborazione con l'azienda Romagna Compost che tratta FORSU da raccolta differenziata per produrre biogas attraverso la fermentazione industriale dry.

4 RISULTATI

La composizione merceologica della frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU) è stata determinata utilizzando i dati di composizione² e quantità degli RSU prodotti (vedi Tabella 4-1), incrociati con dati relativi ai consumi alimentari italiani²⁸ (Tabella 4-2).

Tabella 4-1: composizione merceologica dei rifiuti solidi urbani e produzione procapite.

frazioni merceologiche	composizione % RSU	RSU prodotti (Kg/ab*anno) anno 2006
carta-cartone	22,8%	125,4
plastica-metalli	27,1%	149,1
Vetro	6,3%	34,7
Organico	21,2%	116,6
Verde	11,8%	64,9
RUP	0,3%	1,7
Altri	10,6%	58,3
Totale	100%	550

Tabella 4-2: consumi alimentari italiani, anno 2006

	alimenti consumati procapite(gr/giorno)	Alimenti consumati procapite (Kg/anno)
cereali	258	94,2
legumi	11	4,0
ortaggi	211	77,0
patate	51	18,6
frutta	208	75,9
carne	111	40,5
pesce	45	16,4
caseari	198	72,3
olii	40	14,6
uova	21	7,7
dolci	33	12,0
Totale	1187	433,3

Conoscendo la percentuale di sostanza organica presente nei rifiuti (21,2%) e moltiplicandola per la quantità di RSU prodotta procapite si ottengono i Kg di La FORSU prodotta è circa 117 Kg/ab anno;

ciò significa che su 433 Kg di alimenti l'anno consumati 117 Kg vengono gettati e diventano rifiuto, con una percentuale di scarto media del 26,5%.

La composizione analitica della frazione organica è, ovviamente, difficile da standardizzare in quanto dipende da diversi fattori quali: stagionalità, località, abitudini alimentari, ecc..

Nel fare questo si è impostato come valore fisso la quantità totale (Kg) scartata e si sono modificate le percentuali tenendo conto delle caratteristiche proprie di ogni categoria.

Tabella 4-3: composizione della FORSU (giallo: cerealicoli, verde: vegetali, blu: proteici)

	Alimenti acquistati (kg)	% scarto	alimenti scartati (Kg)	Alimenti consumati (Kg)	composizione % FORSU	raggruppamento per tipologia
cereali	94,17	30%	28,25	65,92	24%	26%
legumi	4,015	30%	1,20	2,81	1%	
ortaggi	77,015	45%	34,66	42,36	30%	64%
patate	18,615	25%	4,65	13,96	4%	
frutta	75,92	45%	34,16	41,76	29%	
carne	40,515	10%	4,05	36,46	3%	
pesce	16,425	20%	3,29	13,14	3%	10%
caseari	72,27	5%	3,61	68,66	3%	
Olii	14,6	5%	0,73	13,87	1%	
Uova	7,665	5%	0,38	7,28	0%	
dolci	12,045	15%	1,81	10,24	2%	
TOTALE	433,255		116,8	316,46	100%	100%

Raggruppando gli alimenti per caratteristiche nutrizionali (Tabella 4-3), è possibile affermare che la FORSU così ricostruita è composta da un 26% di sostanze carboidratose (evidenziate in giallo) , da un 10% di sostanze proteiche (evidenziate in blu) e da un 60% di scarti di origine vegetale (evidenziate in verde).

Conoscendo il consumo alimentare medio (alimenti acquistati) e la suddivisione percentuale degli scarti si è arbitrariamente ipotizzata la percentuale di scarto di alcune tipologie di alimenti selezionati sulla base della dieta tipica della Regione Emilia-Romagna. In base a queste decisioni arbitrarie si è ottenuta la quantità

media di alimenti effettivamente assimilata (alimenti consumati) che corrisponde a 316,5 kg/anno/pro-capite.

Questi dati sono simili ad altri riportati in studi presenti in letteratura (vedi Tabella 4-5 e Tabella 4-5)

Tabella 4-4: composizione merceologia della FORSU (fonte:ENEA²⁹)

pasta e riso	25%	35%
Pane	10%	
carne	10%	10%
verdura	35%	55%
frutta	20%	

Tabella 4-5: composizione merceologica della FORSU ¹⁴

carboidratosi	8%
proteici	23%
vegetali	69%

Come si può notare i dati in letteratura sono piuttosto disomogenei e poco dettagliati, da qui la necessità di effettuare uno studio più approfondito e particolareggiato. Nonostante le evidenti differenze nelle percentuali di composizione del rifiuto i valori ottenuti con le elaborazioni effettuate possono considerarsi in linea con i dati tabulati.

Per verificare che la congruità della quantità mediamente assimilata, si è effettuato un controllo incrociato sul consumo calorico teorico.

Si sono prima calcolate le calorie medie di ogni alimento **Errore. Il segnalibro non è finito.** (Tabella 4-6) e poi, moltiplicandole per le quantità consumate, si è calcolato la quantità di Kcal assunte giornalmente in media rispetto alla scelta arbitraria effettuata (Tabella 4-7).

Tabella 4-6: Calorie medie per 100 g²⁸

ALIMENTO	Kcal/100g	media	ALIMENTO	Kcal/100g	Media
vitello filetto cotto	258	250,3	Cioccolata	545	481
maiale bistecca cotto	247		merendine	444	
pollo intero cotto	246		145	Castagne	165
vitello filetto crudo	107	Mandarini		72	
maiale bistecca crudo	157	Uva		61	
pollo intero crudo	171	Banane		65	
tonno sottolio sgocciolato	192	Mela		53	
merluzzo, nasello	191	Kiwi		44	
Carpa	140	Prugne		42	
Triglia	123	Ananas		40	
Gamberi	85	Ciliegie		38	
Sogliola	81	pere		35	
seppia	72	118	Arance	34	23
Polpo	57		Albicocche	28	
Parmigano	387		Fragole	27	
Pecorino	392		Pesche	25	
Stracchino	300		carote crude	35	
ricotta di vacca	146		Cipolle	26	
Fontina	343		spinaci crudi	31	
Mozzarella	253		Pomodori	19	
grana padano	392		Lattuga	19	
pasta di semola cruda	353		316	melanzane	
pasta all'uovo cruda	366	Zucchine		11	
riso crudo	332	350	fagioli crudi	291	140
pane	289		lenticchie secche	291	
pasta di semola cotta	137	162	fagioli in scatola	91	
pasta all'uovo cotta	122		piselli freschi cotti	91	
riso cotta	100		piselli freschi crudi	52	
Biscotti	454		fagiolini cotti	25	

Per il calcolo delle calorie medie sono stati presi i cibi più comuni e diffusi nella dieta degli italiani. Moltiplicando questi risultati per le quantità di cibi consumati giornalmente per abitante, si ottiene il valore teorico di calorie assunte.

Il calcolo delle calorie però può variare a seconda che si consideri l'alimento come crudo o cotto, specialmente per pasta e carne. Sono state quindi effettuate diverse elaborazioni; i dati ottenuti sono riportati in Tabella 4-7.

Tabella 4-7: calcolo delle calorie assunte giornalmente procapite.

	Kg/anno consumati	Con valori medi		Con alimenti crudi		Con alimenti cotti	
		Kcal per 100 g	Kcal giorno procapite	Kcal per 100 g	Kcal giorno procapite	Kcal per 100 g	Kcal giorno procapite
cereali	65,92	243	438,3	350	632,7	162	292,6
legumi	2,81	140	10,8	140	10,8	140	10,8
ortaggi	42,36	23	26,4	23	26,4	23	26,4
patate	13,96	85	32,5	85	32,5	85	32,5
frutta	41,76	52	59,6	52	59,6	52	59,6
carne	36,46	197,7	197,5	145	144,9	250,3	250,1
pesce	13,14	118	42,3	118	42,3	118	42,3
caseari	68,66	316	594,7	316	594,7	316	594,7
olii	13,87	900	342,0	900	342,0	900	342,0
uova	7,28	128	25,5	128	25,5	128	25,5
dolci	10,24	481	134,9	481	134,9	481	134,9
TOTALE	316,46		1904,5		2046,3		1811,4

Dalle elaborazioni fatte si vede come la variazione nel calcolo delle calorie procapite giornaliere è di 1906 Kcal in un intervallo tra 1811 kcal e 2046 kcal.

I dati in letteratura di fabbisogno energetico giornaliero, riportati in letteratura, differiscono molto a seconda del sesso e dell'attività svolta dal singolo individuo: per un uomo adulto possono andare dalle 2000 alle 3000 kcal/giorno, mentre per una donna si va dalle 1500 alle 2200 kcal/giorno³⁰. La media aritmetica di questi valori risulta di circa 2175 kcal/giorno e, considerando che il valore ottenuto dalle elaborazioni in tabella come una media di tutta la popolazione tra cui bambini e anziani con fabbisogni energetici bassi, il dato di 1904 Kcal/giorno si può considerare un'approssimazione più che accettabile.

Sviluppo di un campione di FORSU modello:

Per lo sviluppo di un campione di FORSU modello sono stati utilizzati i dati elaborati sopra. Data la complessità e la varietà della dieta, per ogni categoria alimentare è stato scelto uno o più cibi che la rappresentassero, esempio: per "cereali" è stata scelta la pasta, per "frutta" sono state scelte le mele, ecc..

Gli alimenti sono stati scelti tra i più presenti e diffusi nella dieta italiana. Inoltre si è preferito utilizzare i cibi più facilmente reperibili piuttosto che altri soggetti

ad una maggiore variabilità stagionale; ad esempio per la frutta sono state scelte le mele perché consumate tutto l'anno, piuttosto che pesche o fragole che hanno un tempo di produzione e consumo limitato a pochi mesi.

La composizione finale del campione è descritta in Tabella 4-8.

Tabella 4-8: composizione del campione di FORSU modello

	composizione % FORSU	Campione teorico (g)	alimenti scelti	%	campione reale (g)
cereali	24%	3,63	Pasta	26%	3,90
legumi	1%	0,15	insalata	16%	2,35
Ortaggi	30%	4,45	carote	8%	1,17
Patate	4%	0,60	pomodori	8%	1,17
Frutta	29%	4,39	Patate	4%	0,61
carne	3%	0,52	Mela	30%	4,43
Pesce	3%	0,42	carne di manzo	4%	0,53
Caseari	3%	0,46	Tonno	3%	0,39
Olii	1%	0,09	Formaggio	3%	0,45
Uova	0%	0,05			
Dolci	2%	0,23			
Totale		15			15

La pasta è stata scelta come rappresentativa di tutti i cereali in quanto i prodotti alimentari contenenti cereali sono principalmente caratterizzati da amido cotto compresi prodotti da forno quali pane e dolci.

Pretrattamenti enzimatici:

Lo scopo del lavoro di tesi è quello di valutare la possibilità di migliorare l'utilizzo della FORSU al fine di produrre biocombustibili tra cui principalmente biogas. La produzione del biogas, partendo da matrici organiche complesse, è strettamente legata alla prima fase idrolitica del processo che è generalmente opera di microrganismi aerobi in grado di secerni enzimi idrolitici eso-cellulari. Lo studio e l'ottimizzazione di un pre-trattamento enzimatico può favorire e migliorare lo stadio idrolitico, accelerando la velocità della fase successive e incrementando le rese di metano. La scelta degli enzimi con cui effettuare i pre-trattamenti è stata effettuata partendo da estratti enzimatici di tipo industriale utilizzati per i processi di bioliquefazione e valorizzazione degli scarti agro-alimentari finalizzati

ad ottenere ingredienti ad alto valore aggiunto nel settore cosmetico e alimentare

Gli enzimi commerciali utilizzati per il trattamento delle matrici ligno cellulose sono 4: Accellerase[®] 1500 e i suoi complementi, BG, XC e XY.

Le attività dichiarate dalla casa produttrice sono indicate in Tabella 4-9

Tabella 4-9: attività enzimatiche dichiarate dalla casa produttrice, espresse come μmol di monomero rilasciato in soluzione al minuto per grammo di enzima

Enzima	attività dichiarata (μmol di monomero rilasciato/g di enzima)
Accellerase	endoglucosidasi: 2200-2800; β -glucosidasi: 525-775
XC	xilanasi: 2500-3800; cellulasi: 1000-1400
XY	xilanasi: 20000-30000
BG	B-glucosidasi: 3000

Queste attività sono state determinate a 50°C e a pH 5.

Trattamenti enzimatici con lipasi:

In un processo di pre-trattamento enzimatico dobbiamo tenere in considerazione il fatto che manca l'azione microbica e quindi gli enzimi devono agire direttamente sul substrato. Le parti grasse o oleose presenti nei rifiuti organici possono costituire un ostacolo fisico all'azione degli enzimi idrolitici quali carboidrasi o proteasi in quanto sono in grado di rivestire le matrici organiche impedendo l'accesso dell'acqua quale veicolante dei biocatalizzatori.

Per questo motivo le lipasi, enzimi che agiscono sui grassi idrolizzando il legame estereo tra glicerina e acido grasso, possono risultare importanti al fine di eliminare la parte grassa della FORSU.

Messa a punto del metodo per la determinazione dell'attività lipasica:

L'attività lipasica in un estratto enzimatico commerciale è stata determinata tramite l'ottimizzazione di un metodo utilizzato in una tesi precedente²⁷; il quale apporta delle modifiche al metodo colorimetrico originale di Lowry & T.²⁵ per la determinazione degli acidi grassi che prevede l'utilizzo dei seguenti materiali e metodi:

- Una soluzione di metil miristato 0,7 M in toluene come substrato (0,5 ml)

- Tampone fosfato 20 mM a pH 8 (2 ml)
- Soluzione acquosa di enzima diluito 1:100 (3 ml)

Questi reagenti vengono aggiunti in una provetta, posti in agitatore orbitale e termostatati a 30°C. Da questi campioni si prelevano, a vari tempi, aliquote di 1 ml della soluzione acquosa, alla quale si aggiungono 0,1 ml di acido solforico 0,1 N per fermare la reazione e 3 ml di toluene per l'estrazione. Si agita mediante vortex per 3 minuti, si centrifuga e si prelevano 2 ml della soluzione organica per il saggio colorimetrico con rame acetato.

Nota: Il rame acetato andrà aggiunto mantenendo la proporzione 1:5, in questo caso 0,4 ml di CuAC per 2 ml di toluene usato per l'estrazione.

Non avendo a disposizione un agitatore orbitale per l'agitazione è stato usato un termoschaker.

Come enzima è stato utilizzato lipasi da *Rhizomucor miehei* (patalase 20000 L) della Sigma-Aldrich. Questo metodo non permette di determinare quantità apprezzabili di attività lipasica, anche ad alte concentrazioni di enzima. (Tabella 4-10).

Tabella 4-10 : attività lipasica determinata tramite il metodo sopra descritto per una lipasi commerciale da *Rhizomucor miehei* (patalase 20000 L)

Assorbanza a diverse concentrazioni di enzima ($\lambda = 715 \text{ nm}$)					
tempo (min)	Concentrato	Dil. 1:20	dil 1:50	dil 1:100	dil 1:200
0	0,23	0,13	0,07	0,05	0,01
30	0,28	0,09	0,12	0,07	0,04
60	0,26	0,08	0,07	0,08	0,05
90	0,28	0,10	0,07	0,09	0,08

La capacità del toluene di estrarre l'acido grasso eventualmente liberato dall'attività enzimatica è stato verificato aggiungendo quantità note di acido miristico da una soluzione in dimetilformammide (DMF) in 3 ml di tampone fosfato al posto della soluzione enzimatica. Si aggiungono poi 5 ml di toluene per l'estrazione. Si agita mediante vortex per 3 minuti, al termine dei quali si prelevano 2 ml della fase organica e si sottopongono a saggio colorimetrico con rame acetato. Ogni prova è stata eseguita in triplo. L'assorbanza è stata misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 715 nm (**Errore. L'origine iferimento non è stata trovata.**).

Tabella 4-11 : verifica dell'estraibilità dell'acido miristico attraverso un'estrazione con una fase organica di toluene

Conc. (M)	Abs teorica	Abs sperimentale			media	dev.st	resa di estrazione
0,00486	0,8992	0,85	0,84	0,84	0,84	0,003	94%
0,0028	0,5340	0,53	0,51	0,50	0,51	0,01	96%
0,0014	0,2857	0,26	0,26	0,27	0,26	0,005	93%

Questi dati sono stati poi riportati in grafico inserendo i valori di concentrazione ottenuti nel test di verifica rispetto a quelli teorici (Figura 4-1)

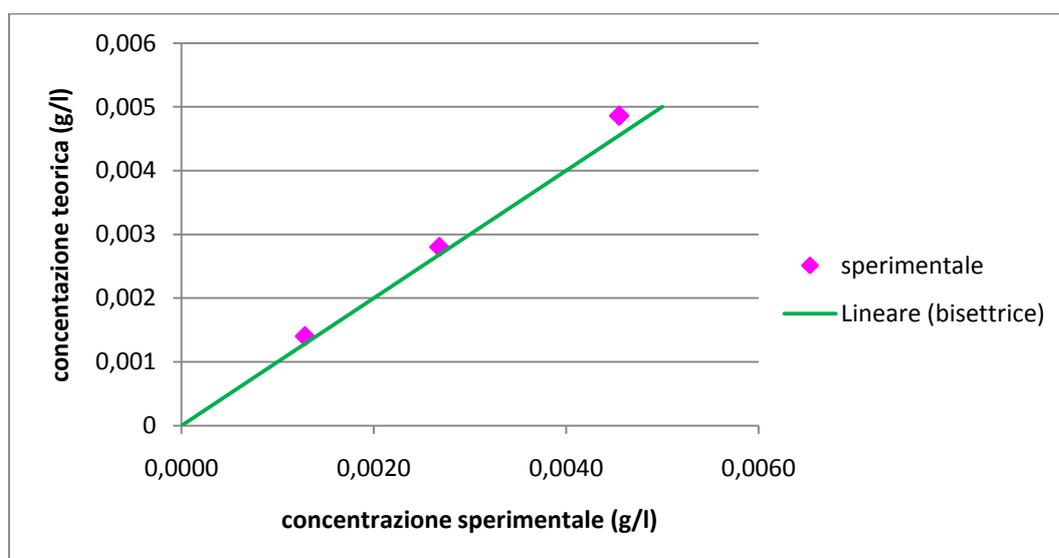


Figura 4-1: concentrazione di acido miristico determinata nei test sperimentali di verifica rispetto ai valori teorici rappresentati dall'andamento della bisettrice (linea verde)

Il grafico così ottenuto mostra che i punti sperimentali si discostano dai valori teorici con una devianza standard inferiore all'1% che convalida il metodo di estrazione con toluene dell'acido miristico dalla soluzione acquosa.

Tale risultato suggerisce che il problema riscontrato nella reazione enzimatica potesse essere dovuto alla scarsa solubilità del metil miristato in soluzione acquosa creando le condizioni per un'attività enzimatica sotto regime diffusivo e non catalitico. Il sistema di agitazione troppo blando impedisce ragionevolmente alla lipasi di svolgere la sua azione a causa di problemi di trasferimento di fase; infatti, l'azione della lipasi deve avvenire all'interfaccia tra la fase di toluene in cui si è disciolto l'estere e la fase acquosa in cui risiede l'enzima.

Prima modifica al metodo

Il toluene è stato, quindi, sostituito con dimetilformammide, un solvente polare aprotico in grado di sciogliere l'estere miristico. L'aggiunta della soluzione di acido miristico in DMF nel tubo di reazione porta il substrato a essere pseudosolubilizzato in fase acquosa, essendo il solvente solubile in acqua. Per determinare un eventuale interferenza del nuovo solvente nel saggio sono stati preparati due ulteriori campioni, per un totale di tre provette:

- 1) Contenente 3 ml di tampone, 2 ml di soluzione enzimatica diluita 1:20 e 0,5 ml di soluzione di estere miristico in DMF
- 2) Con 3 ml di tampone, 2 ml di soluzione enzimatica e 0,5 ml di DMF pura
- 3) Con 5 ml di tampone e 0,5 ml di soluzione di estere miristico in DMF

Da questo ambiente di reazione sono state prelevate delle aliquote da 1 ml come indicato dalla metodica, ma così facendo si avevano delle anomalie nei risultati, a causa della non completa omogeneità del campione (Tabella 4-12).

Tabella 4-12 : attività enzimatica della lipasi da *Rhizomucor miehei* (patalase 20000 L) Su metilmeristato in presenza di dimetilformammide nel tubo di reazione

Tempo(min)	Assorbanza		
	1	2	3
0	0,19	0,05	0,02
30	0,70	0,05	0,06
60	0,68	0,06	0,12
90	0,48	0,05	0,25

Nonostante la disomogeneità dei risultati si osservano dei valori di assorbanza decisamente superiori a quelli ottenuti con il metodo precedente alla stessa concentrazione d'enzima.

Osservando i dati ottenuti per il secondo campione è possibile affermare che la dimetilformammide non interferisce col saggio, in quanto non si sviluppa una colorazione rilevante in assenza di substrato.

Nel terzo campione invece si nota un lieve aumento dell'assorbanza nel tempo anche in assenza di enzima; questo può essere dovuto a impurezze di acido miristico presenti all'interno del metil miristato utilizzato come substrato.

Seconda modifica:

Il metodo è stato successivamente modificato aggiungendo toluene al termine di ogni tempo di reazione al fine di estrarre l'acido miristico formato e l'estere rimasto. Si preleva in seguito un'aliquota di toluene da sottoporre al saggio colorimetrico come da metodica.

Per determinare il volume di toluene sono state fatte prove con 3 e con 5 ml di toluene in tubi di reazione a cui è stata aggiunta una concentrazione di acido miristico in quantità nota cioè 0,5 mL di una soluzione di acido $2,8 \cdot 10^{-2}$ M.

I valori teorici sono stati confrontati con quelli ottenuti sperimentalmente in Tabella 4-13.

Tabella 4-13: prove di estrazione con diversi volumi di toluene

Campione:	Abs massima teorica	Abs sperimentale
Con 3 ml di toluene	0,87	0,78
Con 5 ml di toluene	0,53	0,50

Con 3 ml di toluene è stato estratto il 89,9% dell'acido miristico presente, mentre con 5 ml ne è stato estratto il 93,2%.

Su questa base, si è scelto di operare con cinque ml di volume estraente.

Sono state fatte quindi delle prove con l'enzima diluito 1:100:

- 1) Campione: si preparano 3 provette con 3 ml di tampone fosfato pH8, 2 ml di soluzione enzimatica e 0,5 ml di metil miristato in DMF
- 2) Bianco: si preparano 3 provette con 5 ml di tampone e 0,5 ml di metil miristato in DMF

Le provette sono state estratte a tempi diversi con 5 ml di toluene e sottoposte a saggio colorimetrico (Tabella 4-14). Prima di effettuare l'estrazione, la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 0,1 ml di acido solforico 1 N che, abbassando drasticamente il pH a 2-3 rispetto al pH 8 di reazione, disattiva l'attività enzimatica e porta l'acido miristico nella sua forma indissociata, meno solubile in acqua e più facilmente estraibile.

Tabella 4-14: attività enzimatica della lipasi da da *Rhizomucor miehei* (patalase 20000 L) su metilmeristato aggiunto in DMF e tramite estrazione diretta dell'acido miristico con 5 mL di toluene.

Tempo (min)	Assorbanza		Concentrazione (M)	
	campione	bianco	campione	bianco
0		0,01		-0,0002
60	0,53	0,00	0,0028	-0,0002
120	0,99	0,00	0,0054	-0,0002

Dalle prove preliminari effettuate con questo metodo si ottengono dei valori apprezzabili di concentrazione di acidi grassi rilasciati anche a bassa concentrazione di enzima (1:100). Questi risultati indicano che il saggio così strutturato risolve i problemi di trasferimento di fase riscontrati inizialmente e può quindi essere ritenuto valido.

Caratterizzazione dell'attività enzimatica di alcuni preparati enzimatici commerciali:

Essendo la FORSU costituita in grande parte da scarti di origine vegetale mettere in opera dei pretrattamenti che facilitino l'idrolisi di questa matrice può essere utile ai fini di migliorare i successivi processi di biometanazione.

A tal fine sono stati scelti 4 enzimi commerciali, indicati per il trattamento di matrici ligno-cellulosiche: l'enzima Accellerase 1500 e i suoi complementi, BG, XC e XY.

Sono state determinate l'attività amilasica, xilanasica e pectinasica degli enzimi commerciali a disposizione a diverse temperature e concentrazioni.

L'attività sui diversi substrati di amido, xilano e pectina è stata determinata attraverso la misura del rilascio di zuccheri riducenti nel tempo mediante l'utilizzo del saggio colorimetrico con acido di-nitro salicilico(ADNS).

Come substrati sono state utilizzate delle soluzioni di xilano e amido all'1% e una soluzione di pectina allo 0,3% p/v in tampone Mc Ilvaine a pH 5.

Per rilevare l'eventuale presenza di interferenze nel saggio sono stati eseguiti dei test sulle soluzioni enzimatiche in assenza di substrato

Tabella 4-15: Test di interferenza per le soluzioni enzimatiche, valori di assorbanza ottenuti

Enzima	Accell.	media	BG	Media	XC	media	XY	media
Conc.	1,4589	1,4795	2,5241	2,5425	0,4868	0,4923	0,3933	0,3952
	1,5002		2,5609		0,4978		0,3971	
Dil.1:20	0,0605	0,0637	1,5844	1,5870	0,0418	0,0438	0,0080	0,0080
	0,0669		1,5896		0,0458		0,0079	
Dil.1:50	0,0260	0,0243	0,7083	0,7244	0,0067	0,0060	0,0122	0,0126
	0,0225		0,7405		0,0052		0,0130	
Dil.1:100	0,0126	0,0146	0,3238	0,3171	0,0032	0,0037	0,0060	0,0059
	0,0167		0,3104		0,0041		0,0057	

NOTA: nella prova con enzima concentrato sono stati aggiunti 400 µL di enzima puro a 600 µL di ADNS, mentre per le prove con enzima diluito è stato prima ricreato l'ambiente di reazione con acqua al posto del substrato e poi ne sono stati prelevati 400 µL per il saggio.

Questo test ha evidenziato la presenza di zuccheri riducenti nelle soluzioni enzimatiche utilizzate, specialmente per gli enzimi accellerase e BG. Per le concentrazioni utilizzate nel saggio però presentano valori di interferenze rilevanti solo per l'enzima BG.

I valori di assorbanza così ottenuti dovranno essere sottratti ai dati ottenuti dalle prove di attività enzimatica.

Prove di attività enzimatica:

prima di procedere all'esecuzione delle prove in serie è stato eseguito un test particolareggiato prendendo come substrato lo xilano e come enzima l'accellerase. È stato allestito un solo ambiente di reazione alla volta e i prelievi a ogni tempo sono stati eseguiti in contemporanea (per ogni punto si eseguono due prelievi) per migliorare il più possibile la precisione temporale dell'analisi. Il test è stato fatto per la soluzione enzimatica diluita 1:20 e per quella 1:100. I dati sono riportati nel **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata..**

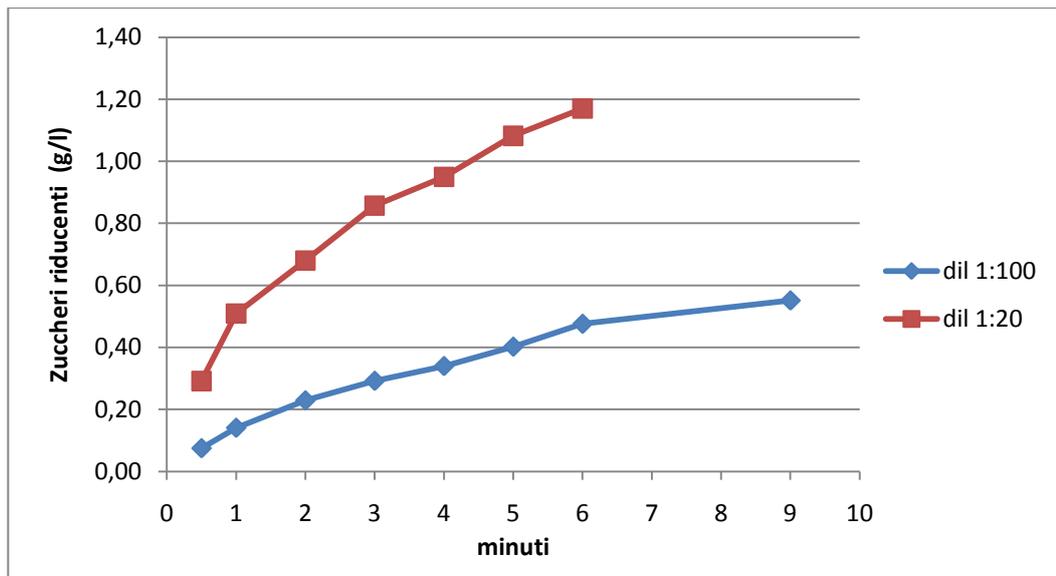


Figura 4-2: concentrazione di zuccheri riducenti in funzione del tempo nella determinazione dell'attività xilanasica per il preparato enzimatico Accelerase in varie concentrazioni (1:20 e 1:100) in presenza di 1% (p/V) di xilano,

La concentrazione di zuccheri rilasciati nel tempo è più alta per la soluzione enzimatica diluita 1:20 rispetto a quella diluita 1:100. Interpolando i primi punti dei due andamenti, si nota una discreta linearità delle cinetiche enzimatiche (Figura 3). La pendenza della retta per la diluizione 1:20 è di 0,51 g/L di prodotto rilasciato al minuto; moltiplicando per il volume di reazione (6 ml) otteniamo la velocità iniziale di reazione: $3,1 \times 10^{-3} g/min$, espressa come quantità di prodotto rilasciato nel tempo.

Applicando lo stesso calcolo per la diluizione 1:100 otteniamo un valore di velocità iniziale pari a $8,4 \times 10^{-4} g/min$.

Confrontando i due valori si nota che la velocità per la diluizione 1:20 è circa 4 volte quella per la diluizione 1:100. Questo denota una certa proporzionalità tra velocità e concentrazione enzimatica.

È probabile quindi che, a causa della scarsa solubilità dello xilano in acqua, dopo qualche minuto di reazione, la concentrazione del substrato non risulti più a saturazione rispetto alla concentrazione dell'enzima per cui la cinetica enzimatica sia governata da un regime diffusivo. La velocità di rilascio degli zuccheri non dipende più dalla velocità di idrolisi enzimatica ma dalla velocità di diffusione dello xilano in acqua. Tale ipotesi è confermata dal fatto che a

concentrazioni enzimatiche inferiori, si allunga il periodo di linearità della velocità iniziale.

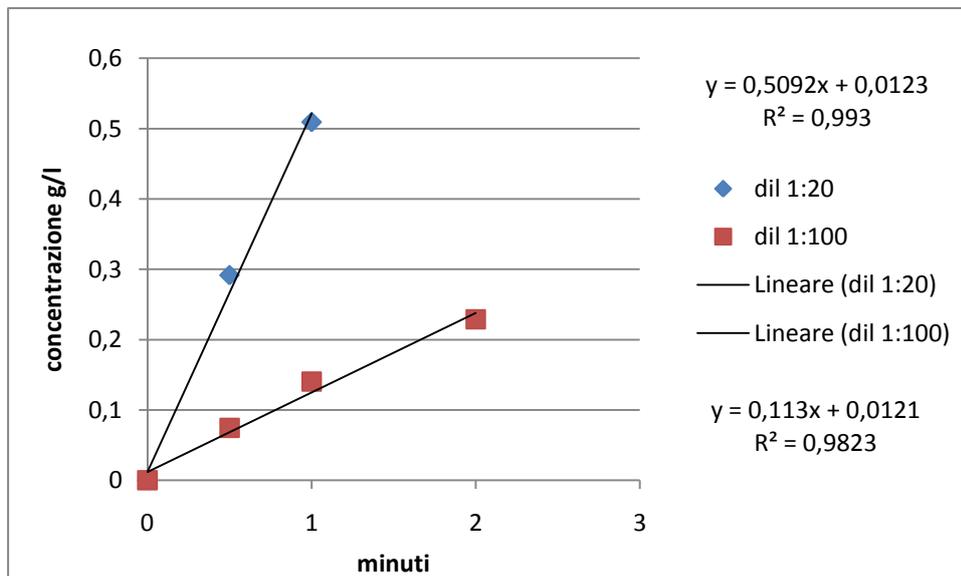


Figura 4-3: determinazione delle velocità iniziali di reazione

A causa del regime diffusivo, si è scelto di effettuare le prove successive per la determinazione dell'attività enzimatica con l'enzima più diluito e tempi di reazione di tre minuti, permettendo, così, una corretta osservazione dei fenomeni idrolitici nel tempo sotto regime catalitico

Determinazione dell'attività amilasica, pectinasi, xilanasica dei vari enzimi:

Si procede con la caratterizzazione degli enzimi commerciali a disposizione, sottoponendoli al saggio per la determinazione dell'attività amilasica, pectinasi e xilanasica. Il saggio utilizzato è quello descritto in precedenza per la rilevazione degli zuccheri riducenti con ADNS.

È stata misurata l'attività a tre minuti per gli enzimi Accellerase, BG, XC e XY a due diverse temperature: 50° e 60°C.

I dati sono riportati nelle tabelle seguenti (da Tabella 4-16 a Tabella 4-23)

Tabella 4-16: Attività dell'enzima BG a 50°C

substrato	Abs a 3 minuti		media	dev.st.	abs corretta	diluz.	conc (g/l)	Attività
xilano	0,11	0,15	0,13	0,02	0,053	4	0,22	0,50
pectina	0,13	0,15	0,14	0,02	-0,021	2	0,06	0,00
amido	0,14	0,16	0,15	0,02	0,071	4	0,31	0,57

Nota: a tutti i valori di assorbanza misurati sono state sottratte le interferenze date dalla presenza di zuccheri all'interno delle soluzioni enzimatiche

Tabella 4-17: attività dell'enzima XY a 50°C

substrato	Abs a 3 minuti		Media	dev.st.	abs corretta	diluizione	conc (g/l)	Attività
xilano	0,43	0,52	0,47	0,06	0,47	4	1,62	3,59
pectina	0,04	0,03	0,03	0,003	0,03	1	0,13	0,20
amido	0,11	0,10	0,10	0,002	0,10	1	0,19	0,36

Tabella 4-18:attività dell'enzima XC a 50°C

substrato	Abs a 3 minuti		Media	dev.st.	abs corretta	diluizione	conc (g/l)	Attività
xilano	0,25	0,18	0,21	0,05	0,21	4	0,76	1,68
pectina	0,09	0,08	0,09	0,004	0,08	1	0,18	0,28
amido	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	1	0,10	0,18

Tabella 4-19: attività dell'enzima accelerase a 50°C

substrato	Abs a 3 minuti		media	dev.st.	abs corretta	diluizione	conc	Attività
xilano	0,03	\	0,03	\	0,02	4	0,13	0,29
pectina	0,07	0,05	0,06	0,01	0,05	1	0,15	0,23
amido	0,05	0,04	0,04	0,007	0,03	1,3	0,14	0,26

Tabella 4-20: attività dell'enzima BG a 60°C

substrato	Abs a 3 minuti		media	dev.st.	abs corretta	diluizione	conc (g/l)	Attività
xilano	0,13	0,20	0,17	0,05	0,09	4	0,34	0,75
pectina	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	8	0,11	0,17
amido	0,02	0,02	0,02	0,001	0,02	4	0,14	0,25

Tabella 4-21: attività enzima XY 60°C

substrato	Abs a 3 minuti		Media	dev.st.	abs corretta	diluizione	conc (g/l)	Attività
xilano	0,49	0,47	0,48	0,01	0,48	4	1,63	3,62
pectina	0,04	0,04	0,04	0,005	0,03	1	0,13	0,21
amido	0,00	0,00	0,00	0,001	0,00	1,3	0,10	0,18

Tabella 4-22: attività enzima XC 60°C

substrato	Abs a 3 minuti		media	dev.st	abs corretta	diluizione	conc (g/l)	attività
xilano	0,42	0,49	0,45	0,05	0,45	2,67	1,30	2,88
pectina	0,13	0,13	0,13	0,002	0,12	1	0,22	0,49
amido	0,01	0,01	0,01	0,000	0,01	1	0,11	0,24

Tabella 4-23: attività enzima Accellerase 60°C

substrato	Abs a 3 minuti		media	dev.st	abs corretta	diluizione	conc (g/l)	attività
xilano	0,01	0,02	0,01	0,003	0,01	2,67	0,07	0,14
pectina	0,05	0,08	0,07	0,02	0,05	1	0,15	0,24
amido	0,05	0,06	0,05	0,009	0,05	1,6	0,18	0,33

L'attività è espressa come micro moli/litro di monomeri rilasciati al minuto calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\text{Attività enzimatica} = [(\text{concentrazione di monomero } (\mu\text{mol/ml})/\text{min reazione})]$$

I dati ottenuti sono stati poi riassunti in diversi grafici sotto riportati.

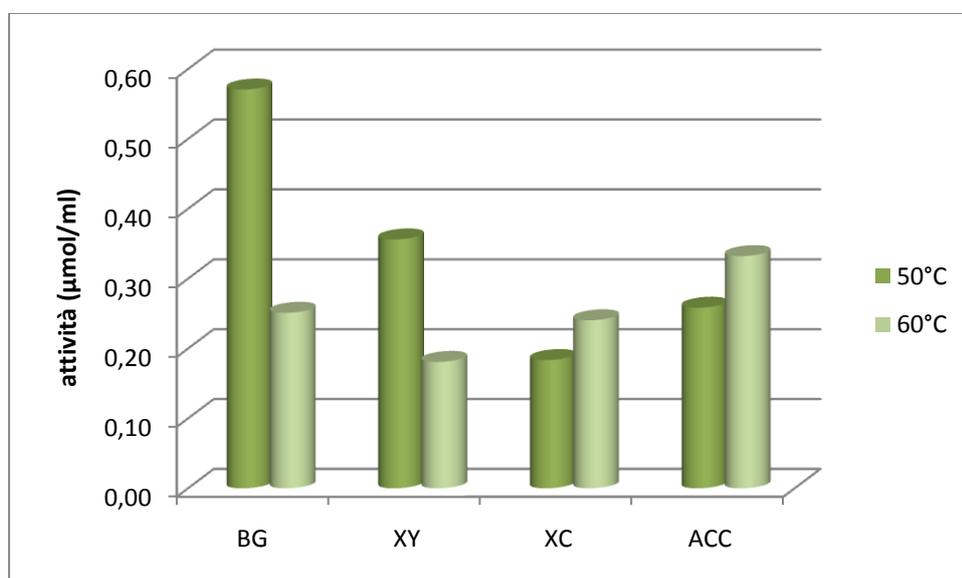


Figura 4-4: confronto dell'azione dei vari enzimi su amido, misurata come rilascio di zuccheri a 50 e 60°C

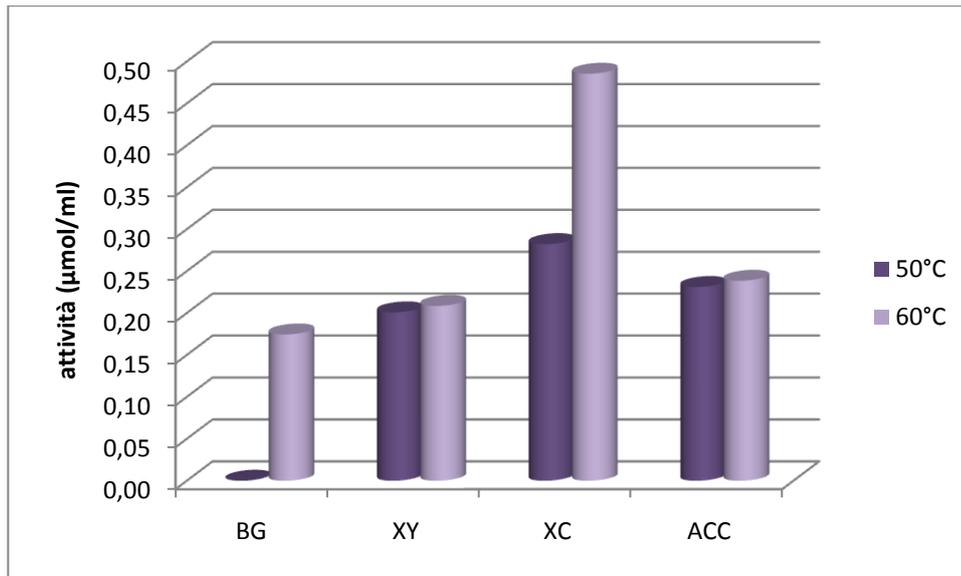


Figura 4-5: confronto dell'azione dei vari enzimi su pectina, misurata come rilascio di zuccheri a 50 e 60°C

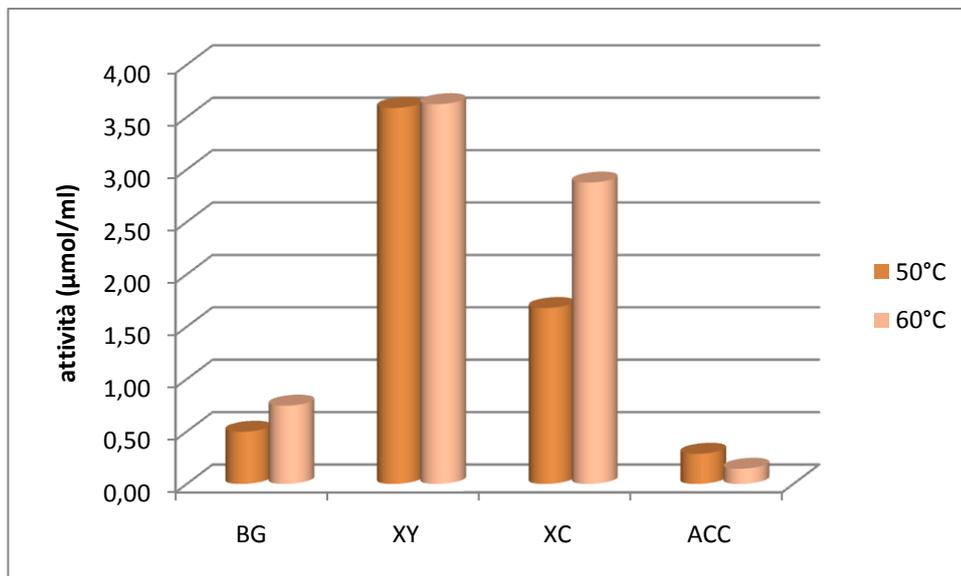


Figura 4-6: confronto dell'azione dei vari enzimi su xilano, misurata come rilascio di zuccheri a 50 e 60°C

Da queste elaborazioni si deduce che l'enzima con la migliore attività xilanasica è l' XY e quello con la migliore attività pectinasi è l' XC.

Riassumendo il tutto in un unico grafico si nota come l'attività pectinasi sia bassa per tutti e quattro gli enzimi.

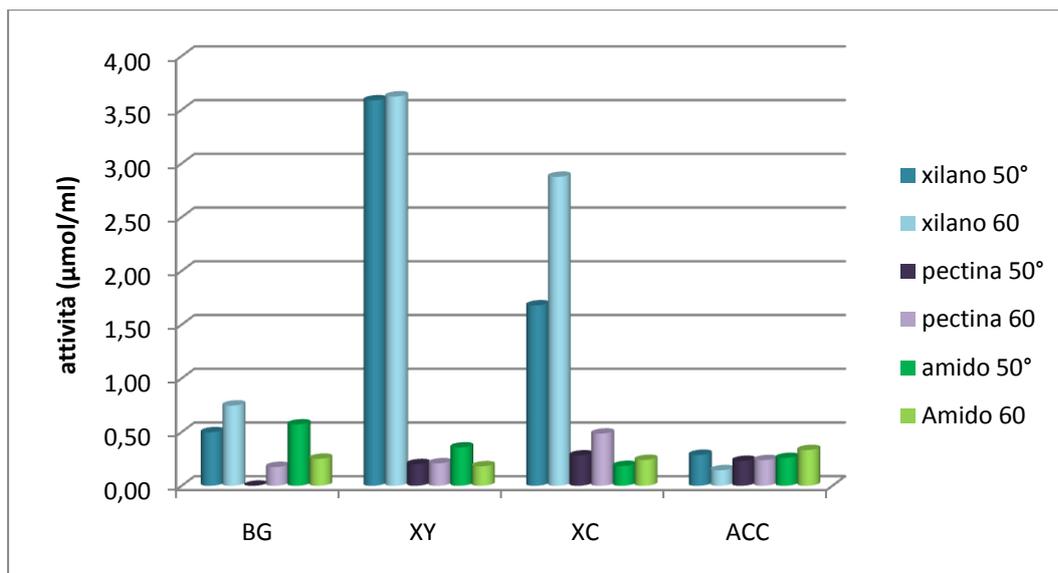


Figura 4-7: grafico riassuntivo dell'attività degli enzimi su vari substrati, a 50 e 60°C

L'attività amilasica presenta delle variazioni significative tra 50 e 60°C: per BG e XY si nota un calo di attività con l'aumento della temperatura, mentre gli altri due subiscono un incremento. È possibile comunque affermare che gli enzimi con le migliori attività amilasiche sono Accellerase e BG.

Le prove eseguite su xilano e pectina presentano un aumento nell'attività con l'aumentare della temperatura, solo per BG e XY su amido si nota una disattivazione.

È possibile confrontare l'attività enzimatica registrata con le attività enzimatiche dichiarate dalla casa produttrice (>):

Tabella 4-24: attività dichiarate dalla casa produttrice, espresse come µmol di monomeri rilasciati al minuto per grammo di enzima

enzima	cellulasi	xilanasasi	B-glucosidasi	endo glucosidasi
XC	1000-1400	2500-3800	\	\
XY	\	20000-30000	\	\
BG	\	\	3000	\
ACC	\	\	525-775	2200-2800

Per confrontare queste attività con quelle ottenute sperimentalmente è necessario uniformare le unità di misura, per cui è necessario ricalcolare l'attività in modo da esprimerla in µmol al minuto per grammo di enzima. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4-25

Tabella 4-25: attività ottenute sperimentalmente espresse come μmol di monomeri rilasciati al minuto per grammo di enzima, temperatura 50°C

	amido	xilano	pectina
XC	99,2	756,0	179,6
XY	192,5	1615,6	127,8
BG	308,4	224,2	60,4
ACC	139,7	129,5	147,0

Le attività xilanasiche rilevate sperimentalmente sono molto inferiori a quelle dichiarate dalla casa produttrice. Questo può essere dovuto al diverso substrato utilizzato nelle analisi, i dati tabulati infatti sono stati determinati su xilano 4-O-metilglucuronico, mentre i dati ottenuti in questa tesi sono stati determinati su una soluzione di xilano all' 1%. Temperatura e pH invece sono analoghi.

Gli enzimi in esame hanno mostrato anche altre attività non espressamente dichiarate dalla casa produttrice quali attività pectinasiche e amilasiche.

L'incremento di zuccheri rilasciati aumentando la temperatura da 50°C a 60°C non è molto rilevante. La maggiore spesa energetica quindi non porta vantaggi rilevanti, rendendo l'operazione antieconomica.

Questo, unito al rischio di disattivazione dell'enzima fanno propendere verso la scelta di 50°C come temperatura di esercizio.

Determinazione dell'attività enzimatica su alimenti:

Dopo aver determinato l'azione dei diversi enzimi su substrati standard si è andati ad investigare sull'azione dell'Accellerase sugli alimenti che andranno a comporre gli scarti organici presenti nella FORSU modello.

Si è scelto di utilizzare l'Accellerase, in quanto è il prodotto principale di riferimento della casa produttrice, mentre gli altri enzimi vengono venduti come complemento.

L'attività dell'accellerase è stata testata su diversi alimenti presi singolarmente alla temperatura di 50°C.

Gli alimenti in esame sono: pane, pasta, biscotti, pomodori, patate, carote, insalata verde, fagiolini, mela e pesca.

L'ambiente di reazione è composto da 2 g di campione, 18 ml di tampone McIlvaine pH 5 e 2 ml di soluzione enzimatica diluita 1:100.

in pratica, per ogni grammo di substrato sono stati utilizzati 0,01 g di enzima,

$$\text{rapporto enzima/substrato} = 1/100$$

Alimenti cerealicoli:

Si allestiscono due beute con all'interno 2 g di substrato e 18 ml di tampone, in una delle quali verranno aggiunti 2 ml di soluzione enzimatica, mentre nell'altra, il controllo, verranno aggiunti 2 ml di acqua in sostituzione dell'enzima.

Al fine di valutare gli incrementi di zuccheri riducenti rilasciati dalle diverse matrici in presenza dell'enzima, è stata fatta un'operazione di normalizzazione del dato dividendo ogni concentrazione ottenuta nel corso dell'analisi per la concentrazione misurata a tempo zero. Tra gli alimenti ricchi di carboidrati sono stati analizzati pane, pasta e biscotti.

La pasta è stata sottoposta a cottura prima dell'analisi ottenendo i risultati riportati in Tabella 4-26:

Tabella 4-26: test di rilascio di zuccheri nel tempo su pasta, enzima accellerase, 50°C

tempo(min)	abs campione	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	Valore normalizzato
0	0,37	0,36	0,37	1	0,44	1,00
30	0,44	0,40	0,42	4	1,64	3,74
60	0,82	0,72	0,77	4	2,91	6,64
120	0,57	0,53	0,55	8	4,14	9,44
240	0,50	0,55	0,52	12	5,86	13,37
300	0,62	0,61	0,61	12	6,84	15,60
360	0,74	0,76	0,75	12	8,36	19,07
tempo(min)	abs Bianco	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	Valore normalizzato
0	/	/	/	/	/	1,00
30	0,63	0,60	0,62	1	0,67	1,52
60	0,41	0,36	0,39	2	0,81	1,84
120	0,46	0,45	0,45	2	0,93	2,12
240	0,50	0,45	0,47	2	0,96	2,20
300	0,50	0,46	0,48	2	0,98	2,23
360	0,52	0,50	0,51	2	1,04	2,37

Nota: in quest'analisi manca il dato a tempo zero per il bianco, per il calcolo della concentrazione normalizzata si è preso come riferimento il tempo zero del campione

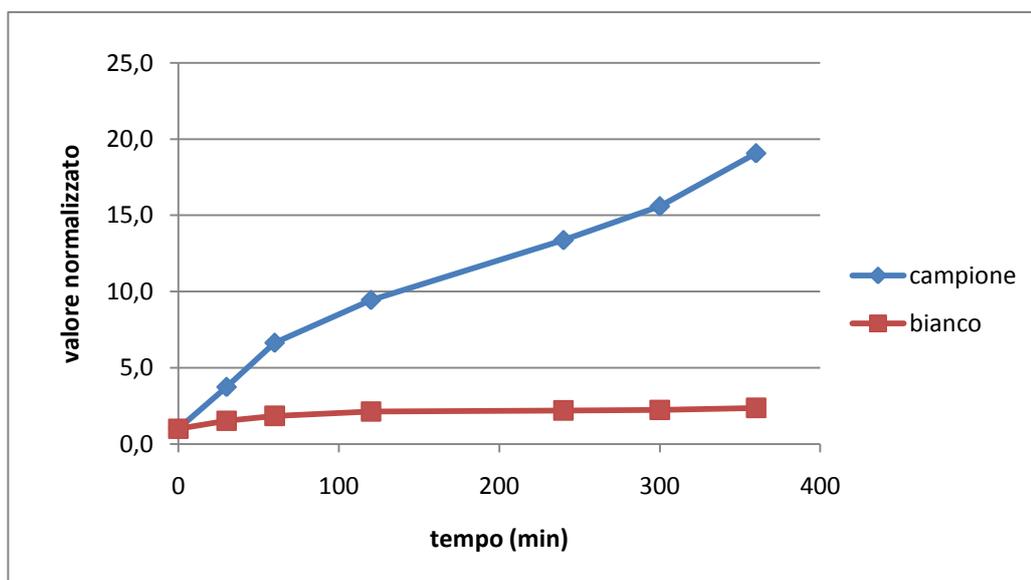


Figura 4-8: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accellerase su pasta, 50°C

In modo analogo sono stati analizzati biscotti (frollini) e pane (toscano insipido).

Tabella 4-27: Test di rilascio di zuccheri nel tempo su biscotti frollini, enzima accellerase, 50°C

tempo(min)	abs campione		media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	conc. normalizzata
0	1,21	1,19	1,20	0,02	1	1,20	1,00
30	0,37	0,38	0,38	0,006	8	2,85	2,38
60	0,76	0,79	0,78	0,02	8	5,80	4,84
120	0,91	0,95	0,93	0,03	12	10,28	8,58
240	0,91	0,88	0,90	0,02	16	13,24	11,05
300	0,88	0,81	0,84	0,06	20	15,57	13,00
360	0,94	0,90	0,92	0,03	20	17,01	14,20
tempo(min)	abs Bianco		media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	conc. normalizzata
0							1,00
30	0,07	0,08	0,07	0,005	1	0,17	0,14
60	0,13	0,12	0,12	0,009	8	1,02	0,85
120	0,19	0,23	0,21	0,03	8	1,63	1,36
240	0,30	0,32	0,31	0,01	8	2,36	1,97
300	0,37	0,36	0,37	0,005	8	2,80	2,34
360	0,38	0,36	0,37	0,01	8	2,83	2,36

Nota: in quest'analisi manca il dato a tempo zero per il bianco, per il calcolo del valore normalizzato si è preso come riferimento il tempo zero del campione

i risultati sono stati normalizzati e riportati in grafico:

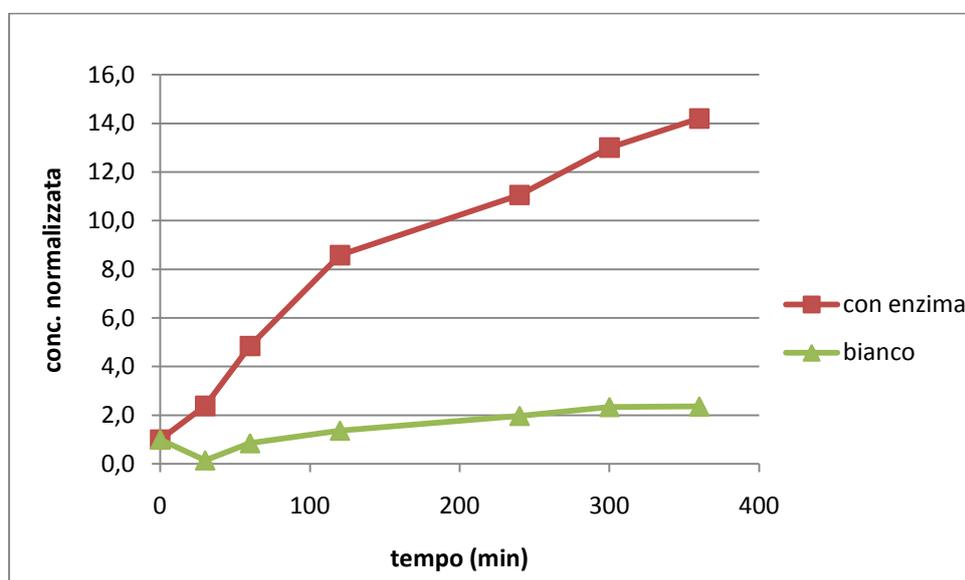


Figura 4-9: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accellerase su biscotti frollini, 50°C

Tabella 4-28: Test di rilascio di zuccheri nel tempo su pane toscano, enzima accelerase, 50°C

tempo(min)	abs campione		media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	1,12	1,26	1,19	0,10	1	1,16	1,00
30	0,37	0,37	0,37	0,001	10	3,44	2,97
60	0,44	0,45	0,44	0,008	10	4,13	3,56
120	0,60	0,60	0,60	0,001	10	5,59	4,82
240	0,60	0,60	0,60	0,001	12	6,69	5,76
300	0,64	0,68	0,66	0,03	12	7,33	6,32
360	0,65	0,65	0,65	0,002	12	7,27	6,27
tempo(min)	abs Bianco		media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	0,97	1,02	1,00	0,036	1	0,98	1,00
30	0,27	0,26	0,26	0,004	10	2,49	2,53
60	0,28	0,27	0,27	0,007	10	2,58	2,62
120	0,34	0,33	0,33	0,004	10	3,14	3,20
240	0,31	0,30	0,31	0,003	10	2,89	2,94
300	0,30	0,30	0,30	0,000	10	2,85	2,89
360	0,35	0,36	0,35	0,008	10	3,32	3,37

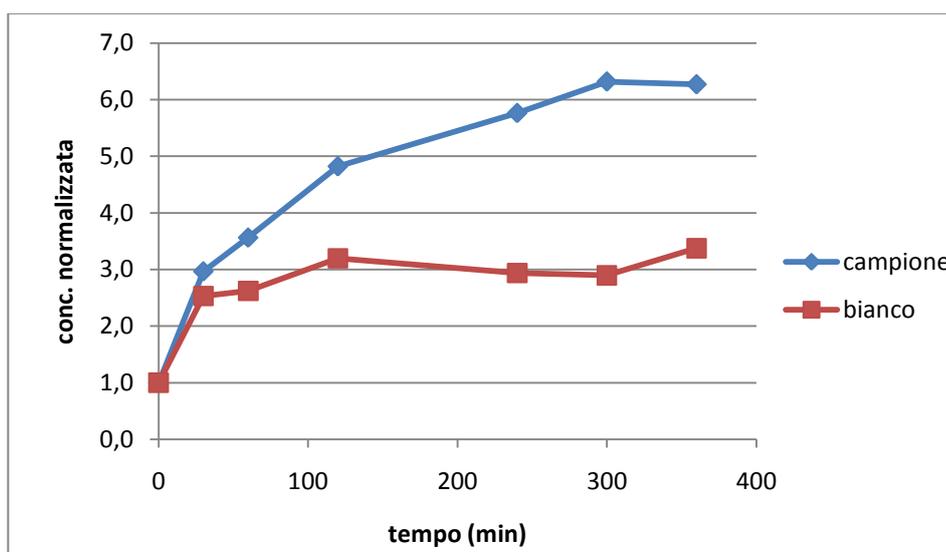


Figura 4-10: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accellerase su Pane, 50°C

Si può notare come su questi substrati si abbia un consistente aumento degli zuccheri rilasciati in soluzione nel campione contenente enzima. Nel bianco invece si ha solo un leggero aumento dei valori misurati, dovuto ragionevolmente a zuccheri semplici liberi presenti nel substrato che vengono rilasciati in soluzione per diffusione.

Questi risultati sono coerenti con le prove di attività enzimatiche effettuate su substrati modello, l'Accellerase, infatti, mostrava una buona attività sull'amido.

La resa di zuccheri riducenti per ogni matrice trattata è data da:

$$\frac{(conc. campione - conc. bianco) \times vol di reazione(L)}{g di substrato} =$$
$$= g. di zuccheri rilasciati per g. di substrato$$

La Tabella 4-29 riporta le rese in zuccheri riducenti delle matrici a base di amido.

Tabella 4-29: g di zuccheri rilasciati per g di substrato sottoposto a idrolisi enzimatica dopo 360 minuti di reazione a 50°C

	Per g di sub. umido	Per g di sub. secco
pasta	0,0732	0,1558
biscotti	0,1418	0,1418
pane	0,0378	0,0540

Pasta e biscotti presentano un rilascio di zuccheri simile per grammo di substrato secco. La pasta dopo cottura aumenta il proprio contenuto di umidità del 50%, per cui, a parità di peso, la quantità di zuccheri rilasciata si dimezza.

Il pane presenta dei valori di zuccheri riducenti rilasciati in soluzione sensibilmente inferiori a quelli di pasta e biscotti. La percentuale di umidità contenuta nel pane è del 30%.

Trattamenti enzimatici su frutta e verdura:

Allo stesso modo sono stati analizzati campioni di patate e carote senza sottoporli a previa cottura. Si sono ottenuti i seguenti risultati

Tabella 4-30 : Test di rilascio di zuccheri nel tempo su carota cruda, enzima amilasi, 50°C

Tempo (min)	Abs campione	Media	dil	conc(g/L)	abs Bianco	media	dil	conc(g/L)
0	0,22	0,25	1	0,29	0,31	0,32	1	0,36
	0,28				0,33			
60	0,18	0,18	10	1,77	0,22	0,22	10	2,10
	0,19				0,22			
120	0,17	0,18	10	1,69	0,26	0,26	10	2,43
	0,18				0,26			
240	0,22	0,22	10	2,11	0,24	0,24	10	2,30
	0,22				0,25			
300	0,24	0,24	10	2,26	0,25	0,25	10	2,38
	0,24				0,25			

Nota: Dil sta per diluizione del campione

Tabella 4-31 : Test di rilascio di zuccheri nel tempo su patata cruda, enzima amilasi, 50°C

Tempo (min)	abs campione	media	Dil	Conc (g/L)	abs Bianco	media	Dil	Conc (g/L)
0	0,02	0,01	1	0,08	0,01	0,01	1	0,07
	0,01				0,01			
30	0,36	0,35	1	0,39	0,29	0,30	1	0,34
	0,33				0,30			
60	0,51	0,52	1	0,55	0,44	0,45	1	0,48
	0,53				0,46			
120	0,62	0,63	1	0,64	0,51	0,52	1	0,55
	0,64				0,53			
240	0,28	0,28	2	0,58	0,20	0,20	2	0,44
	0,28				0,20			
300	0,29	0,29	2	0,60	0,22	0,22	2	0,47
	0,29				0,22			
330	0,83	0,83	1	0,83	0,60	0,59	1	0,60
	0,82				0,57			

Anche questi dati sono stati normalizzati, in modo analogo a quelli dei substrati cerealicoli, e riportati in grafico.

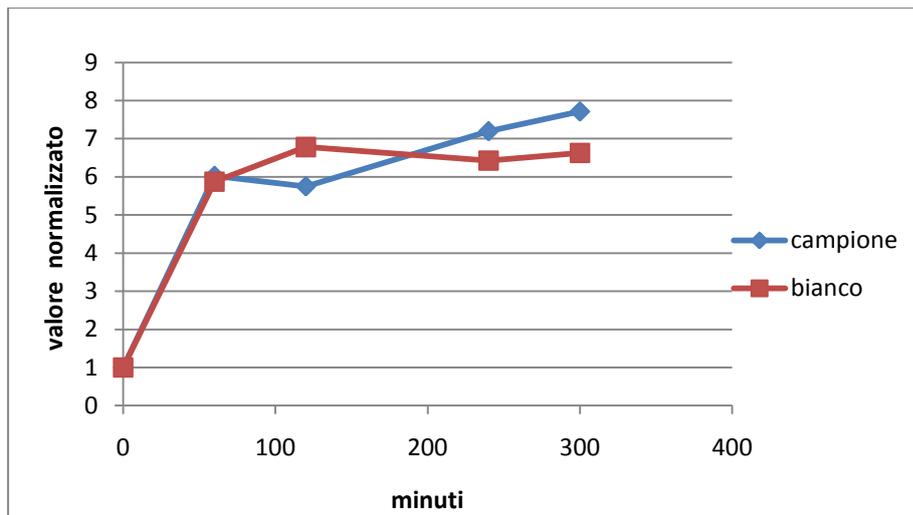


Figura 4-11: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accellerase su carota cruda, 50°C

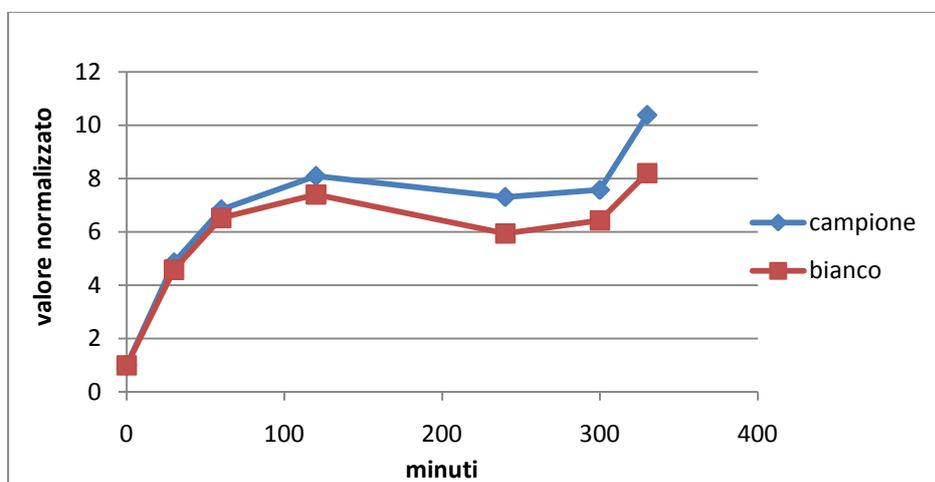


Figura 4-12: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accellerase su Patata cruda, 50°C

Si osserva che l'enzima non presenta un'azione significativa su questi substrati.

La patata, che è composta essenzialmente di amido, avrebbe dovuto mostrare valori in linea con quelli di pane e pasta. Tuttavia, i dati inferiori riscontrati di attività enzimatica sono probabilmente dovuti dalla diversa forma in cui l'amido è presente (cotto o crudo). I prodotti a base d'amido, precedentemente trattati, sono, infatti, caratterizzati da amido cotto a differenza della patata naturale in cui l'amido è crudo. Per questo motivo è stata eseguita un'ulteriore prova utilizzando gli stessi substrati sottoposti prima a cottura in acqua bollente per 15 minuti.

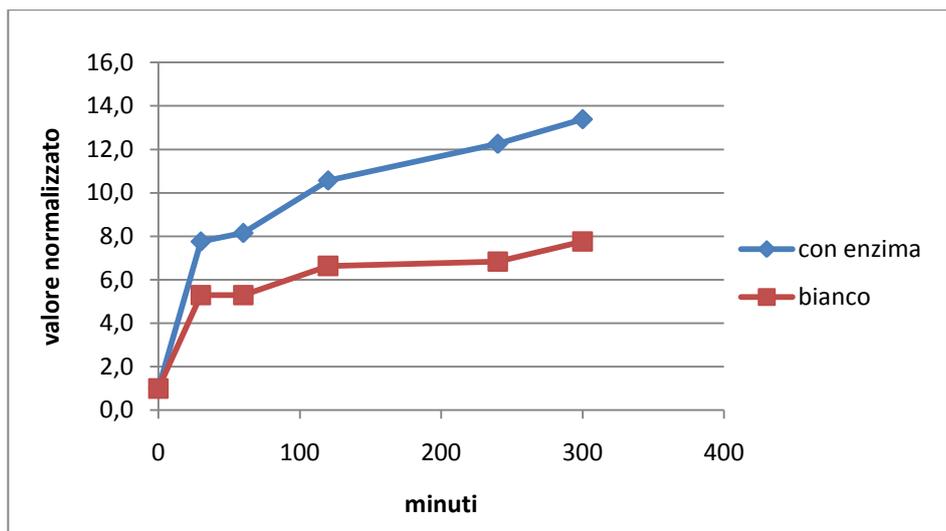


Figura 4-13: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accellerase su carota cotta, 50°C

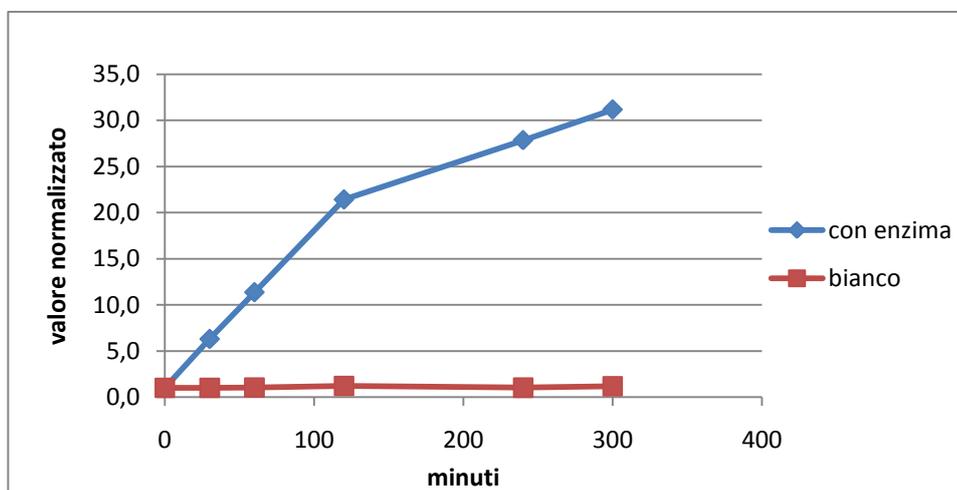


Figura 4-14: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accellerase su Patata cotta a 50°C

Come si può vedere dal grafico l'azione dell'enzima accellerase sulla patata cotta è decisamente superiore rispetto a quello sulla patata cruda. L'effetto della cottura causa una gelificazione dell'amido, rigonfiando la matrice vegetale per effetto dell'assorbimento di acqua e favorendo così l'azione enzimatica. Noti sono, infatti, i processi di saccharificazione dell'amido di mais per la produzione di sciroppi di glucosio che richiedono un pre-trattamento di gelificazione ad alta temperatura.

L'amido passa quindi da una struttura ordinata ad una struttura disordinata con caratteristiche di gel. Questa modificazione fisica rende l'amido molto più aggredibile da parte degli enzimi idrolitici.

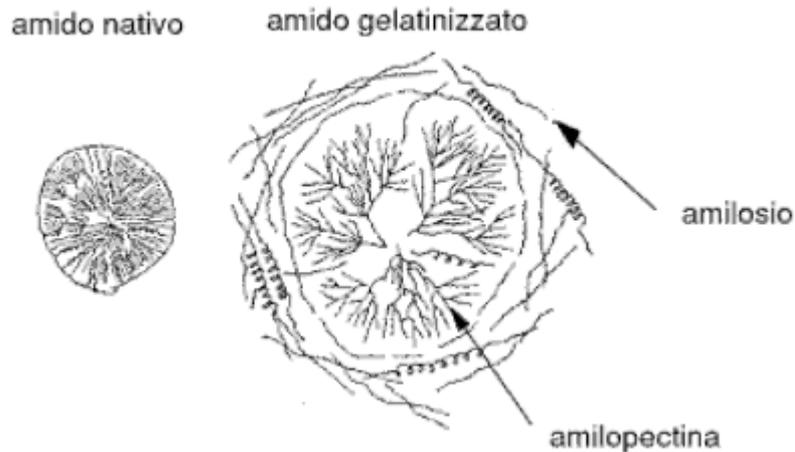


Figura 4-15: struttura dell'amido, prima e dopo gelatinizzazione³¹

L'azione sulla carota invece non mostra un incremento così forte di zuccheri riducenti rilasciati in soluzione. Questo dipende dalla diversa natura chimica dei due substrati, la carota infatti ha un alto contenuto di acqua (91,6%) e poche fibre (3,1%) mentre i carboidrati sono presenti come zuccheri solubili (7,6%)**Errore. Il segnalibro non è definito..** Le fibre sono prevalentemente costituite da pectine per cui l'azione idrolitica per via enzimatica richiederebbe l'azione di una pectinasi che non è significativamente presente nei preparati enzimatici commerciali analizzati.

Sono state, quindi, verificate le attività dell'Accelerase su pomodoro, insalata verde, fagiolini, mela e pesca.

Tabella 4-32: Test di rilascio di zuccheri nel tempo su pomodoro, enzima accelerase, 50°C

tempo(min)	abs campione	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	0,42	0,37	0,40	1	0,43	1,00
30	0,76	0,77	0,76	2	1,47	3,40
60	0,35	0,36	0,35	5	1,69	3,89
120	0,26	0,26	0,26	8	1,98	4,58
240	0,17	0,17	0,17	12	1,95	4,51
300	0,17	0,17	0,17	12	1,94	4,49
360	0,18	0,18	0,18	12	2,06	4,76
tempo(min)	abs Bianco	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	0,39	0,53	0,46	1	0,49	1,00
30	0,64	0,65	0,64	2	1,25	2,57
60	0,28	0,30	0,29	5	1,40	2,87
120	0,23	0,23	0,23	8	1,77	3,63
240	0,14	0,13	0,14	12	1,56	3,21
300	0,13	0,15	0,14	12	1,61	3,31
360	0,12	0,12	0,12	12	1,36	2,81

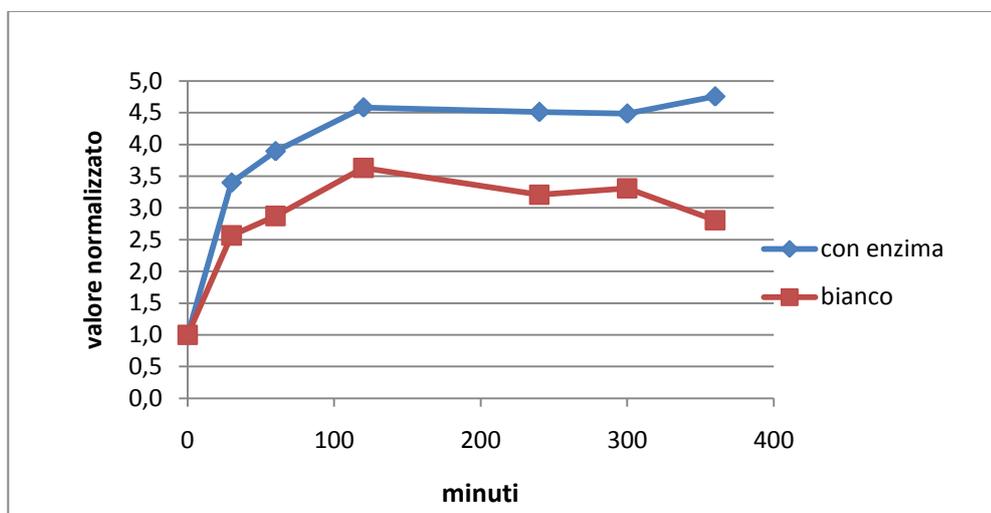


Figura 4-16: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accelerase su pomodoro, 50°C

Tabella 4-33: Test di rilascio di zuccheri nel tempo su fagiolini, enzima Accellerase, 50°C

tempo(min)	abs campione		media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	0,52	0,53	0,53	0,005	1	0,55	1,00
30	0,21	0,21	0,21	0,001	5	1,04	1,88
60	0,22	0,23	0,23	0,01	5	1,11	2,01
120	0,25	0,25	0,25	0,0002	5	1,23	2,24
240	0,31	0,30	0,30	0,004	5	1,46	2,65
300	0,32	0,33	0,32	0,002	5	1,56	2,83
360	0,34	0,34	0,34	0,002	5	1,64	2,98
1380	1,22	1,21	1,21	0,01	2	2,30	4,17
tempo(min)	abs Bianco		media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	0,26	0,23	0,24	0,02	1	0,29	1,00
30	0,11	0,11	0,11	0,0001	5	0,57	1,94
60	0,12	0,12	0,12	0,002	5	0,62	2,14
120	0,12	0,12	0,12	0,001	5	0,60	2,07
240	0,14	0,14	0,14	0,003	5	0,71	2,43
300	0,14	0,13	0,14	0,01	5	0,70	2,41
360	0,14	0,15	0,14	0,003	5	0,73	2,51
1380	0,47	0,46	0,47	0,005	2	0,93	3,18

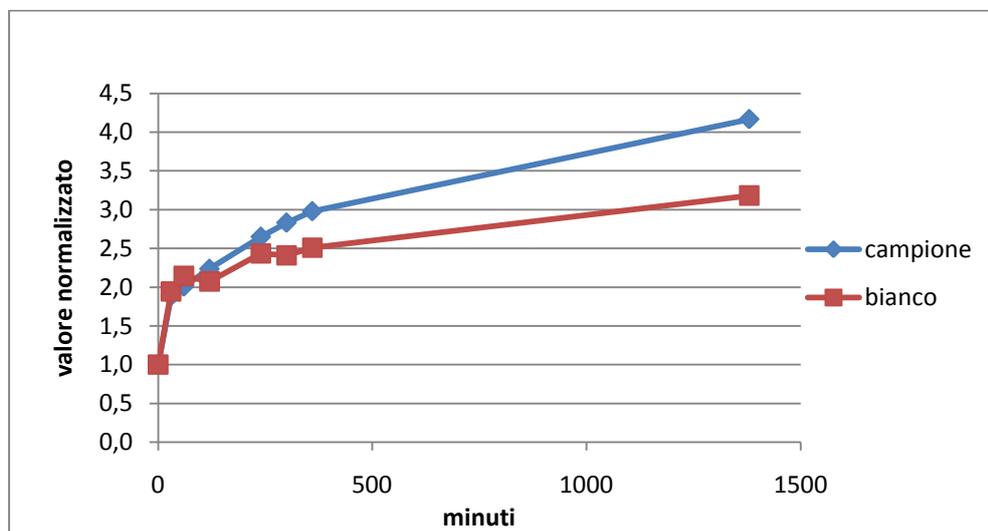


Figura 4-17: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accellerase su fagiolini, 50°C

Tabella 4-34: Test di rilascio di zuccheri nel tempo su pesca, enzima Accellerase, 50°C

tempo(min)	abs campione	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	0,15	0,15	0,003	2	0,34	1,00
30	0,13	0,12	0,01	8	1,00	2,92
60	0,19	0,18	0,004	8	1,44	4,19
120	0,22	0,22	0,000	8	1,69	4,93
180	0,22	0,22	0,004	8	1,67	4,88
300	0,20	0,21	0,004	8	1,56	4,55
330	0,25	0,24	0,005	8	1,85	5,39
tempo(min)	abs Bianco	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	0,22	0,21	0,004	2	0,47	1,00
30	0,15	0,16	0,002	8	1,22	2,61
60	0,21	0,21	0,001	8	1,60	3,44
120	0,22	0,23	0,01	8	1,75	3,74
180	0,23	0,22	0,005	8	1,75	3,74
300	0,24	0,25	0,005	8	1,87	4,01
330	0,25	0,26	0,003	8	1,95	4,19

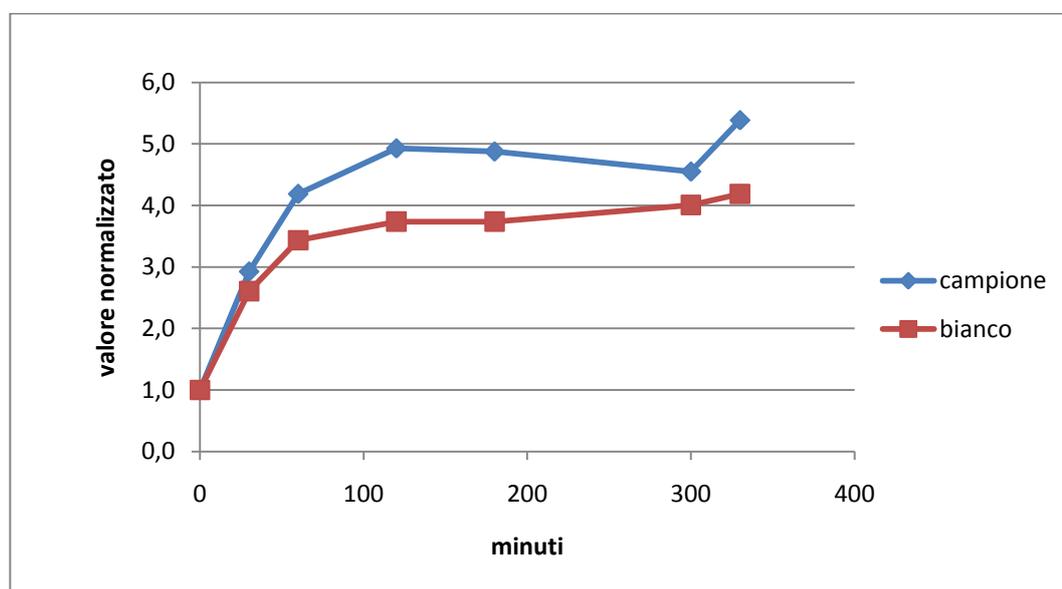


Figura 4-18: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accellerase su pesca, 50°C

Tabella 4-35: test su polpa di insalata verde, enzima Accellerase, 50°C

tempo(min)	abs campione	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	0,02	0,02	0,02	1	0,07	1,00
30	0,10	0,08	0,09	1	0,13	1,90
60	0,23	0,24	0,24	1	0,27	3,75
120	0,33	0,34	0,33	1	0,35	4,99
240	0,41	0,39	0,40	1	0,41	5,81
300	0,43	0,46	0,44	1	0,45	6,36
325	0,44	0,45	0,45	1	0,45	6,41
tempo(min)	abs Bianco	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	0,00	0,01	0,01	1	0,06	1,00
30	0,10	0,10	0,10	1	0,14	2,36
60	0,17	0,17	0,17	1	0,21	3,43
120	0,28	0,27	0,28	1	0,30	5,00
240	0,35	0,35	0,35	1	0,37	6,11
300	0,37	0,36	0,37	1	0,38	6,35
325	0,37	0,38	0,38	1	0,39	6,52

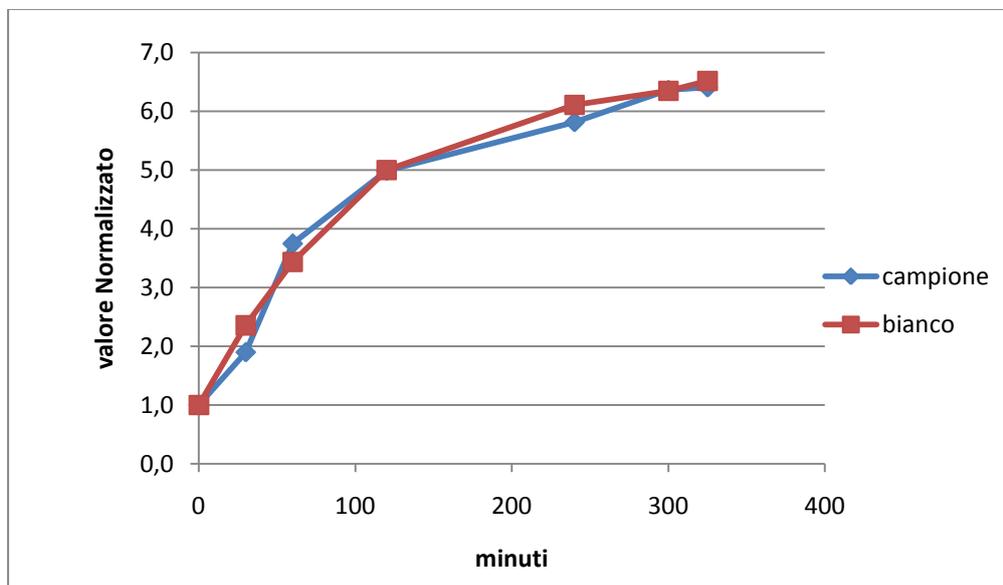


Figura 4-19: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accellerase su insalata, 50°C

Tabella 4-36: test su polpa di mela, enzima Accellerase, 50°C

tempo(min)	abs campione	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	0,70	0,66	0,68	0,03	2	1,32
30	0,49	0,49	0,49	0,003	10	4,56
60	0,56	0,56	0,56	0,004	12	6,26
120	0,55	0,54	0,55	0,004	16	8,11
240	0,52	0,50	0,51	0,009	20	9,43
300	0,52	0,52	0,52	0,001	20	9,70
tempo(min)	abs Bianco	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	0,69	0,68	0,68	0,008	2	1,32
30	0,47	0,47	0,47	0,002	10	4,41
60	0,59	0,58	0,58	0,001	12	6,51
120	0,57	0,56	0,56	0,009	16	8,35
240	0,51	0,50	0,50	0,007	20	9,27
300	0,57	0,52	0,54	0,03	20	10,05

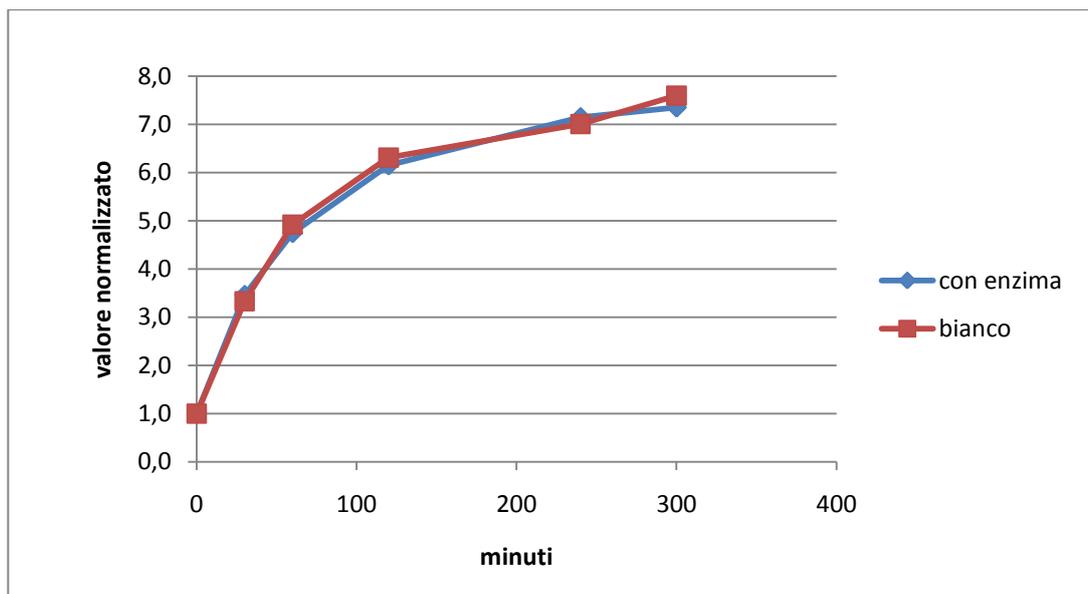


Figura 4-20: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accellerase su polpa di mela, 50°C

Tabella 4-37: test su buccia di mela, enzima Accellerase, 50°C

tempo(min)	abs campione	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato	
0	1,49	1,44	1,47	0,03	2	2,77	1,00
30	0,81	0,80	0,81	0,01	10	7,47	2,70
60	0,78	0,75	0,76	0,03	12	8,51	3,07
120	0,58	0,60	0,59	0,01	16	8,76	3,17
240	0,48	0,43	0,45	0,03	20	8,43	3,05
300	0,44	0,43	0,43	0,01	20	8,04	2,91
tempo(min)	abs Bianco	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato	
0	1,50	1,42	1,46	0,05	2	2,75	1,00
30	0,71	0,70	0,70	0,01	10	6,55	2,38
60	0,69	0,68	0,69	0,01	12	7,66	2,78
120	0,55	0,55	0,55	0,005	16	8,18	2,97
240	0,42	0,42	0,42	0,01	20	7,78	2,83
300	0,44	0,45	0,45	0,01	20	8,26	3,00

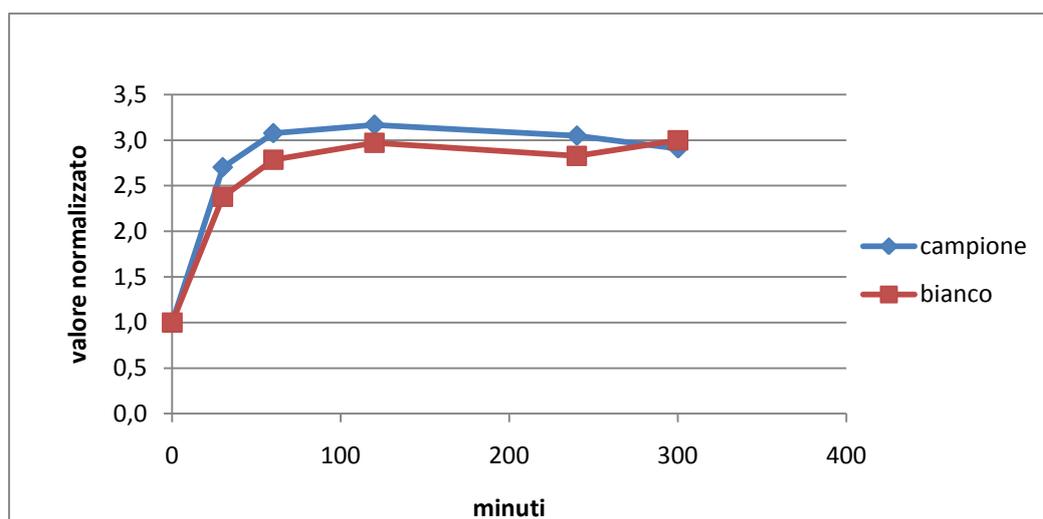


Figura 4-21: rilascio di zuccheri nel tempo per azione dell'enzima Accellerase su buccia di mela, 50°C

L'Accelerase non presenta attività idrolitiche significative su questi substrati. A differenza dei fagiolini e dell'insalata che presentano matrici ricche di emicellulose, caratterizzate prettamente da catene arabinoxiliche, pomodorini, pesche e mela sono certamente più ricchi di fibre pectiche.

Ulteriori approfondimenti sono stati fatti sulla mela cotta verificando anche l'azione dei complementi dell'accelerese (XC, XY, BG).

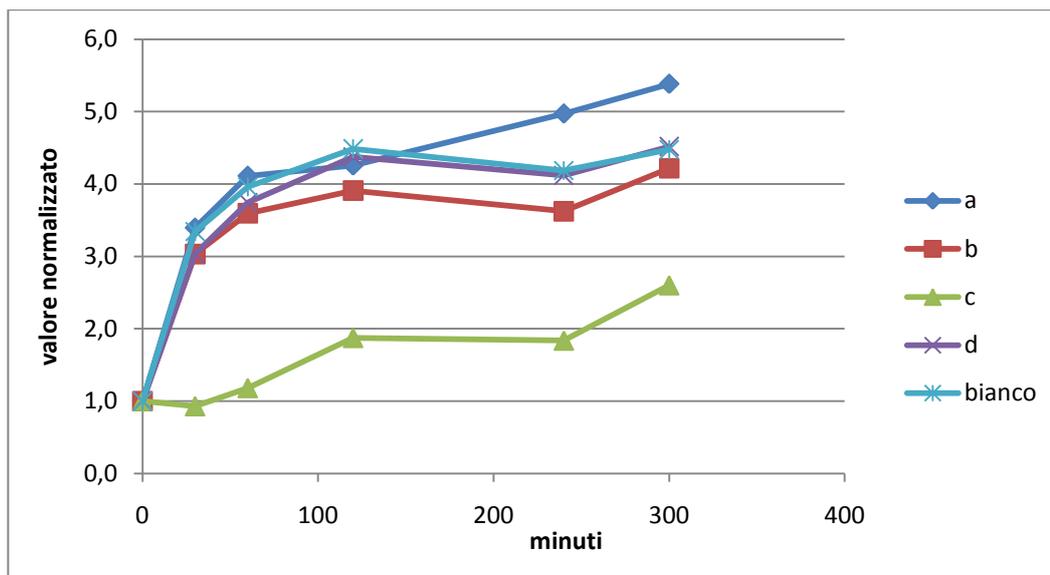


Figura 4-22: azione dei diversi enzimi su mela cotta (a = Accelerase, b = BG, c = XY, d = XC), 50°C

L'Accelerase si conferma l'enzima con la migliore attività idrolitica su questo substrato, confermando la mancanza in generale di attività pectinasiche in questi preparati enzimatici. Inoltre, si è osservato una riduzione dell'attività idrolitica dell'Accelerase sulla matrice cotta a differenza di quanto osservato con le matrici amidacee. Tale risultato può essere attribuito alla diversa caratteristica di azione gelificante che subisce la fibra pectica e quella amidacea. Infatti, la gelificazione della pectina porta a un consistente coordinamento dell'acqua sulla fibra che funge da azione di protezione all'attacco enzimatico. La gelificazione dell'amido porta, invece, ad una maggiore quantità di acqua assorbita fisicamente nella fibra. Del resto la produzione di marmellate industriali tramite la gelificazione della pectina è un tipico esempio di conservazione alimentare per l'industria delle conserve.

Trattamenti enzimatici su FORSU modello:

Dopo aver analizzato l'azione degli enzimi su i vari alimenti presi singolarmente si è andato a verificare l'azione enzimatica con accelerase, XC, XY, BG su un campione di FORSU modello come descritta in precedenza.

Le proporzioni campione-enzima-soluzione tampone sono le stesse utilizzate nelle analisi sui singoli substrati: 10% di substrato in una soluzione tampone contenente il 10% di soluzione enzimatica (in questo caso: 15g campione, 15 ml soluzione enzimatica, 135 ml di soluzione tampone pH 5). I risultati ottenuti sono stati “normalizzati”, ovvero le concentrazioni sono state tutte divise per la concentrazione presente al tempo zero; in modo da poter confrontare campioni con valori iniziali diversi. In Tabella 4-38 è riportato un esempio di analisi con accelerase; in questo caso la concentrazione normalizzata è stata ottenuta dividendo tutti i valori per 1,164 (concentrazione al tempo zero).

Tabella 4-38 : analisi sul campione di FORSU con Accellerase, 50°C.

Tempo (min)	abs campione		media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	1,22	1,25	1,24	0,03	1	1,16	1,00
30	0,24	0,23	0,23	0,003	10	2,17	1,86
60	0,36	0,36	0,36	0,006	10	3,29	2,83
180	0,55	0,53	0,54	0,009	10	4,90	4,21
240	0,61	0,64	0,62	0,02	10	5,66	4,87
285	0,65	0,61	0,63	0,02	10	5,71	4,90

Tabella 4-39: analisi sul campione di FORSU con BG, 50°C.

tempo(min)	abs campione		media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	1,76	1,72	1,74	0,03	1	1,62	1,00
30	0,27	0,27	0,27	0,003	10	2,49	1,54
60	0,45	0,43	0,44	0,01	10	3,98	2,46
180	0,70	0,67	0,69	0,02	10	6,24	3,86
240	0,78	0,78	0,78	0,001	10	7,05	4,36
285	0,80	0,82	0,81	0,01	10	7,35	4,55

Tabella 4-40: analisi sul campione di FORSU con XC, 50°C.

tempo(min)	abs campione		media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	1,23	1,30	1,27	0,05	1	1,19	1,00
30	0,21	0,21	0,21	0,0005	10	1,91	1,60
60	0,30	0,30	0,30	0,003	10	2,75	2,30
180	0,55	0,56	0,55	0,005	10	5,02	4,20
240	0,57	0,57	0,57	0,0005	10	5,22	4,37
285	0,55	0,55	0,55	0,002	10	5,02	4,21

Tabella 4-41: analisi sul campione di FORSU con XY, 50°C.

tempo(min)	abs campione	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	1,75	1,75	1,75	0,002	1	1,62
30	0,19	0,19	0,19	0,001	10	1,77
60	0,35	0,34	0,35	0,003	10	3,17
180	0,56	0,52	0,54	0,03	10	4,92
240	0,60	0,60	0,60	0,002	10	5,42
285	0,61	0,62	0,61	0,01	10	5,57

Tabella 4-42: analisi sul campione di FORSU senza enzima (bianco), 50°C.

tempo(min)	abs bianco	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato
0	1,93	1,92	1,92	0,006	1	1,78
30	0,25	0,24	0,25	0,000	10	2,26
60	0,36	0,36	0,36	0,004	10	3,29
180	0,55	0,57	0,56	0,02	10	5,07
240	0,68	0,67	0,68	0,005	10	6,14
285	0,66	0,66	0,66	0,00	10	6,01

I risultati ottenuti in tutte le prove sono stati riassunti in Figura 4-23.

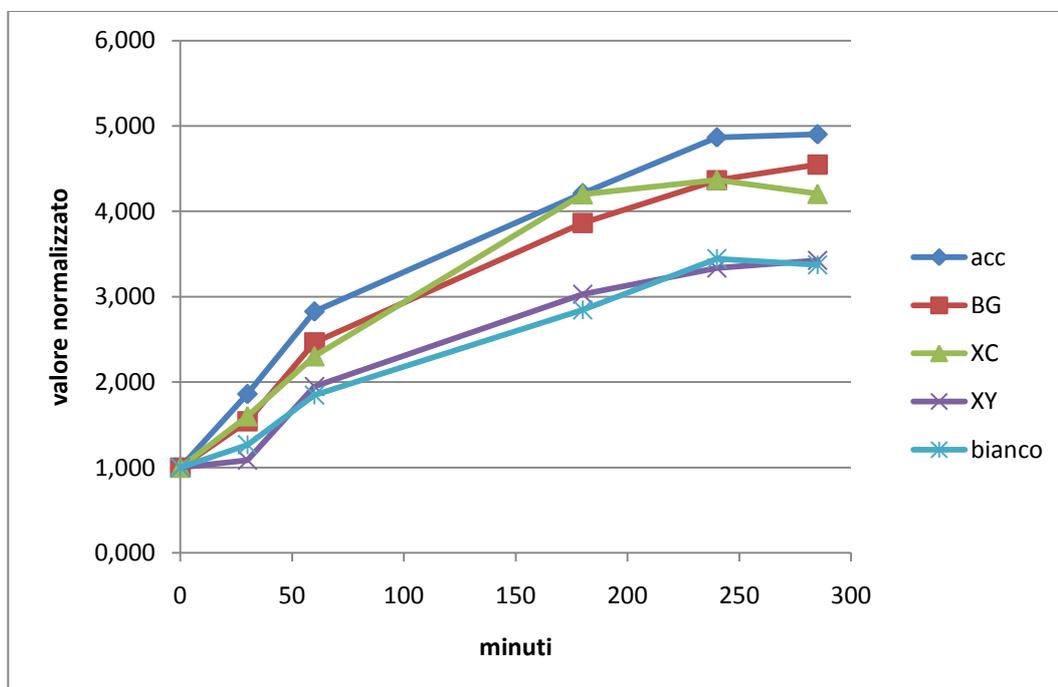


Figura 4-23: Azione dei diversi enzimi su FORSU modello, 50°C

L'enzima più efficace risulta essere l'Accellerase.

Conoscendo l'azione dell'enzima sui diversi substrati di cui è composto il campione di FORSU modello è possibile identificare il contributo di ogni alimento all'incremento di concentrazione misurato in quest'analisi.

Dopo 280 minuti la differenza di concentrazione tra il campione con enzima (Accellerase) e il bianco è di 1,53 g/l.

È probabile che l'incremento di concentrazione maggiore sia dovuto agli alimenti cerealicoli, per questo motivo calcoliamo il contributo di zuccheri rilasciati dall'idrolisi della pasta.

I grammi di pasta presenti nel campione sono 3,86.

Sapendo che, dopo 300 minuti, l'incremento di zuccheri in soluzione (g) per g di pasta è di 0,059 (calcolato in precedenza); si trovano i g di zuccheri rilasciati nel campione di FORSU:

$$0,059 \times 3,86 = 0,23 \text{ g}$$

Dividendo per il volume di reazione si trova la concentrazione (g/l)

$$0,23 \div 0,15 = 1,52 \text{ g/l}$$

Andando a confrontare questo dato con la variazione di concentrazione misurata nel campione (1,53 g/l) si calcola il contributo percentuale della pasta nell'aumento totale di zuccheri.

Si trova che la pasta è responsabile dell'aumento di zuccheri registrato nell'analisi del campione di FORSU per il 99,3 %.

Ne consegue che i restati alimenti presenti non sembrano subire degradazioni significative, coerentemente con quanto osservato dalle specifiche reazioni sui singoli substrati. Tale risultato sembra dimostrare una scarsa influenza di azioni sinergiche e/o inibitorie delle diverse matrici che compongono la FORSU modello.

Trattamenti enzimatici su substrati non alimentari:

L'analisi merceologica della FORSU presenta un contenuto molto variegato di sostanze putrescibili tra cui anche materiali non alimentari come le cellulose derivanti prevalentemente da carta per uso alimentare oppure nuove matrici biodegradabili come il MaterBi. Infatti alcune tipologie di carta (es: scottex e fazzoletti usati) non possono essere riciclate in cartiera e possono essere smaltite come rifiuto organico, mentre numerosi oggetti biodegradabili quali sacchetti per la spesa, piatti usa e getta, ecc, sono composti da MaterBi . Questi oggetti a fine vita vengono assimilati ai rifiuti organici e smaltiti come FORSU.

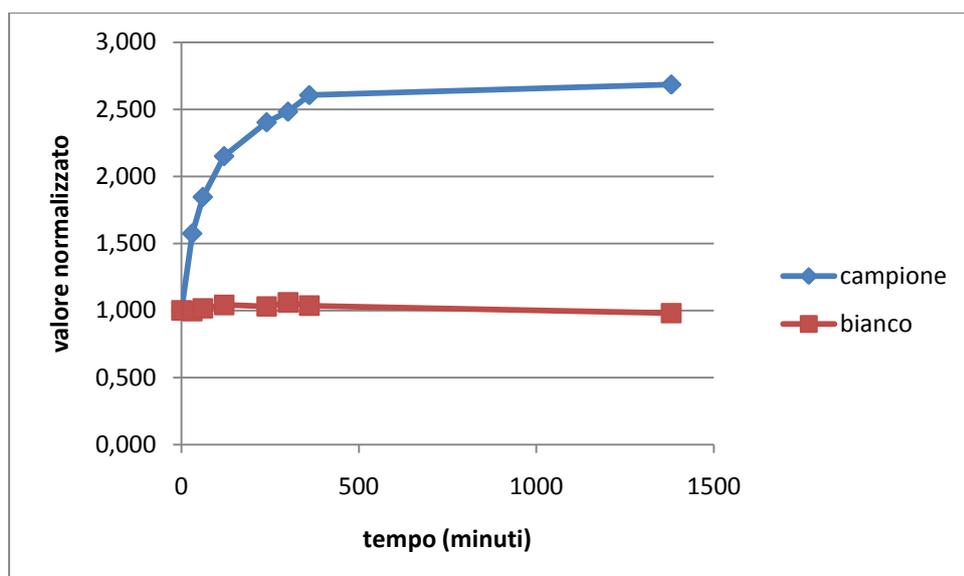
Spesso però questo tipo di materiale crea problemi all'interno degli impianti di compostaggio, avendo tempi di decomposizione più elevati rispetto alla normale sostanza organica.

Utilizzando lo stesso metodo usato per il trattamento enzimatico su substrati alimentari si è verificata l'azione dell'enzima Accellerase su MaterBi.

Tabella 4-43: test su MaterBi, enzima Accellerase, 50°C

tempo(min)	abs campione	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato	
0	0,07	0,06	0,07	0,01	1	0,13	1,00
30	0,15	0,14	0,15	0,003	1	0,20	1,57
60	0,18	0,19	0,18	0,01	1	0,24	1,85
120	0,22	0,23	0,23	0,01	1	0,27	2,15
240	0,26	0,26	0,26	0,0001	1	0,31	2,40
300	0,27	0,27	0,27	0,005	1	0,32	2,48
360	0,29	0,28	0,29	0,01	1	0,33	2,61
1380	0,30	0,30	0,30	0,0002	1	0,34	2,68
tempo(min)	abs Bianco	media	dev.st.	diluizione	conc (g/L)	valore normalizzato	
0	0,00	0,00	0,00	0,0002	1	0,07	1,00
30	0,00	0,00	0,00	0,0002	1	0,07	0,99
60	0,00	0,00	0,00	0,001	1	0,07	1,02
120	0,01	0,00	0,01	0,003	1	0,07	1,04
240	0,00	0,01	0,00	0,003	1	0,07	1,03
300	0,01	0,01	0,01	0,002	1	0,07	1,06
360	0,01	0,00	0,00	0,003	1	0,07	1,04
1380	0,00	0,00	0,00	0,0001	1	0,07	0,98

I risultati sono stati normalizzati e riportati in grafico.



In questo caso si nota un notevole rilascio di zuccheri in soluzione per il campione contenente enzima. L'azione idrolitica risulta coerente con la composizione del Mater-Bi che è costituito prevalentemente da amido di mais modificato per renderlo plastico. L'utilizzo di pretrattamenti enzimatici su questa matrice è un indice di elevata biodegradabilità della matrice e può, dunque, risultare importante per velocizzare e migliorare gli eventuali processi di decomposizione.

Allo stesso modo è stata verificata l'azione dei preparati enziatici commerciali su cellulosa.

In questo caso sono state cambiate le condizioni di reazione: a 0,5 g di carta vengono aggiunti 25 ml di tampone pH 5 e o, 25 ml di enzima puro. La temperatura di esercizio è di 30°C. i dati sono riportati nelle seguenti tabelle (da Tabella 4-44 a Tabella 4-48)

Tabella 4-44: rilascio di zuccheri riducenti nel tempo ad opera dell'enzima Accellerase su cellulosa

tempo (min)	Abs campione	media	Abs corr.	diluizione	conc (g/l)	valore normalizz.	
0	0,20	0,19	0,18	0,16	1	0,20	1,00
60	0,85	0,87	0,85	0,83	2	1,55	7,78
120	0,65	0,65	0,63	0,62	5	2,84	14,24
240	0,53	0,53	0,52	0,50	10	4,58	22,95
300	0,59	0,60	0,58	0,57	10	5,15	25,80
360	0,75	0,73	0,72	0,71	10	6,43	32,21
1500	0,77	0,77	0,76	0,74	20	13,40	67,15

Tabella 4-45: rilascio di zuccheri riducenti nel tempo ad opera dell'enzima BG su cellulosa

tempo (min)	Abs campione		media	Abs corr	diluizione	conc (g/l)	valore normalizz.
0	2,76		2,73	2,71	1	2,49	1,00
60	0,33	0,31	0,30	0,27	10	2,48	1,00
120	0,34	0,34	0,32	0,29	10	2,69	1,08
240	0,35	0,36	0,33	0,31	10	2,81	1,13
300	0,37	0,36	0,34	0,31	10	2,85	1,15
360	0,37	0,37	0,34	0,32	10	2,90	1,17
1500	0,45	0,45	0,42	0,40	10	3,64	1,46

Tabella 4-46: rilascio di zuccheri riducenti nel tempo ad opera dell'enzima XC su cellulosa

tempo (min)	Abs campione		media	Abs corr	diluizione	conc (g/l)	valore normalizz.
0	0,05	0,04	0,04	0,04	1	0,09	1,00
60	0,17	0,15	0,15	0,15	2	0,31	3,63
120	0,24	0,24	0,24	0,23	2	0,47	5,41
240	0,33	0,33	0,32	0,32	2	0,63	7,24
300	0,37	0,36	0,36	0,35	2	0,69	7,92
360	0,37	0,38	0,37	0,37	2	0,71	8,19
1500	0,60	0,60	0,60	0,59	2	1,12	12,91

Tabella 4-47: rilascio di zuccheri riducenti nel tempo ad opera dell'enzima XY su cellulosa

tempo (min)	Abs campione		media	Abs corr	diluizione	conc (g/l)	valore normalizz.
0	0,07	0,07	0,07	0,06	1	0,11	1,00
60	0,28	0,28	0,28	0,27	2	0,54	5,03
120	0,54	0,53	0,53	0,53	2	1,00	9,25
240	0,89	0,88	0,88	0,88	2	1,63	15,11
300	1,09	1,10	1,09	1,08	2	2,00	18,51
360	0,83	0,81	0,81	0,81	3	2,24	20,68
1500	0,54	0,55	0,54	0,53	10	4,86	44,95

Tabella 4-48: rilascio di zuccheri riducenti nel tempo di cellulosa in assenza di enzima (bianco)

tempo (min)	Abs Bianco		media	dev.st	diluizione	conc (g/l)	valore normalizz.
0	0,00	0,01	0,01	0,00	1	0,06	1,00
60	0,00	0,00	0,00	0,00	1	0,06	0,95
120	0,00	0,00	0,00	0,00	1	0,06	0,97
240	0,01	0,01	0,01	0,00	1	0,06	1,03
300	0,00	0,00	0,00	0,00	1	0,06	0,98
360	0,00	0,01	0,01	0,00	1	0,06	1,02
1500	0,01	0,01	0,01	0,00	1	0,06	1,04

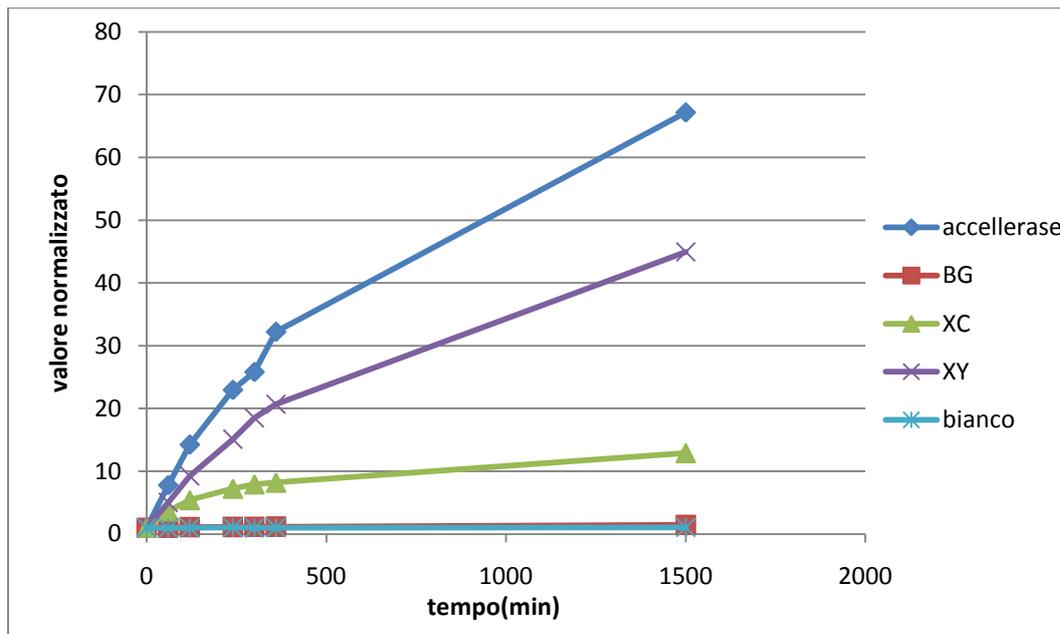


Figura 4-24: azione dei diversi enzimi su cellulosa, 30°C

Dai dati raccolti si evince che l'enzima Accelerase è quello che presenta una maggiore azione su questo substrato; messa visivamente in evidenza dalla disgregazione del campione di cellulosa trattato, mentre gli altri appaiono sostanzialmente intatti. La maggiore disgregazione è anche indice di una significativa attività endo-cellulasica dell'Accelerase piuttosto che eso-cellulasica delle altre componenti.

5 CASO STUDIO:

I pre-trattamenti enzimatici per migliorare i processi idrolitici della biomassa vegetale posso trovare interessanti applicazioni nella produzione di biogas da scarti agro-alimentari e/o da FORSU. Come possibile campo di applicazione della ricerca svolta è stata presa come caso studio l'azienda Romagna Compost srl. L'azienda è situata a Cesena, località San Carlo, si occupa della gestione di un impianto di compostaggio anaerobico per il trattamento dei rifiuti organici provenienti dalla raccolta differenziata.

È dotata di 11 reattori batch (biocelle) per la fermentazione anaerobica della sostanza organica, possiede una platea con aereazione forzata per l'affinamento aerobico della biomassa in uscita dai fermentatori.

Tutto l'impianto è sotto leggera aspirazione per ridurre al minimo l'emissione di inquinanti in atmosfera e per il controllo degli odori.

Prima di essere rimessa in atmosfera il flusso d'aria viene convogliato in un apparato di bio-filtrazione che depura la corrente in uscita.

Il biogas prodotto viene poi inviato a due motori a combustione interna (cogenerazione) per la produzione di energia elettrica da 0,5 MW l'uno per un totale di potenza installata pari a un megawatt.

L'impianto è anche dotato di un piccolo depuratore per purificare le acque reflue dell'impianto.

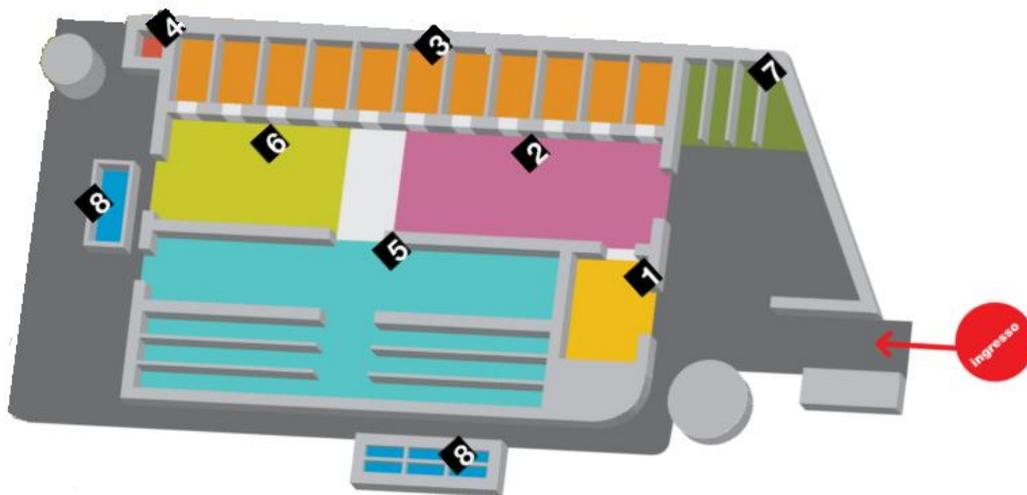


Figura 25: descrizione riassuntiva dell'impianto (1 = accettazione e stoccaggio materia prima, 2 = triturazione e preparazione del materiale, 3 = reattori di digestione anaerobica batch, 4 = motori per la produzione di energia elettrica, 5 = platea aerea, 6 = raffinazione del compost, 7 = stoccaggio compost, 8 = biofiltro e depuratore per le acque reflue)³²

Il funzionamento dell'impianto è riassunto in Figura 26.

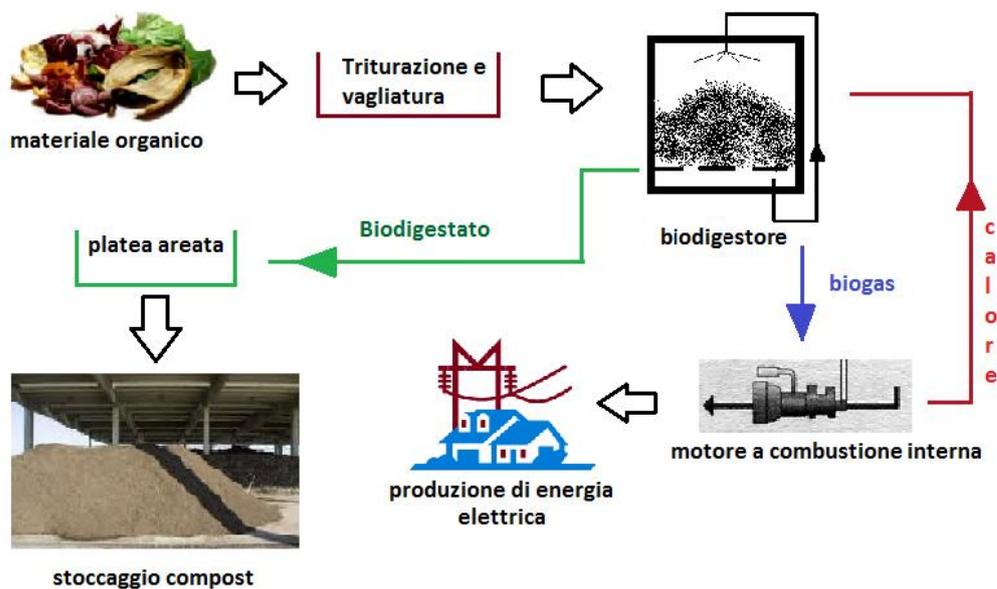


Figura 26: schema riassuntivo di funzionamento dell'impianto di Romagna Compost

Descrizione tecnica dell'impianto:

Le matrici trattate dall'impianto di Romagna Compost sono:

- Frazione organica dei rifiuti urbani proveniente da raccolta differenziata (FORSU)
- scarti vegetali provenienti da attività industriali
- materiale ligno-cellulosico proveniente da attività di manutenzione del verde pubblico e privato.

Come si vede in Tabella 49 la percentuale di materiali non compostabili (MNC) presenti all'interno della FORSU conferita all'impianto è del 7,4 %; della quale la maggior parte è formata da plastica.

Tabella 49: composizione merceologica della FORSU conferita all'impianto di Romagna Compost, marzo 2011.

Materiale	u.m.	valore
sacchetto plastica	%	1,9
plastica	%	1,9
vetro	%	0,5
metalli	%	0,5
inerti	%	0,3
Altro	%	2,3
TOTALE MNC	%	7,4

Pre-trattamento meccanico della FORSU:

La presenza di una significativa quantità di materiale non putrescibile nella FORSU richiede un trattamento preliminare di tipo meccanico del rifiuto. La FORSU viene triturata e sottoposta a vagliatura per eliminare l'eventuale presenza di materiali non compostabili presenti come impurezze nei flussi di raccolta differenziata.

La riduzione della pezzatura del rifiuto inoltre favorisce i successivi processi fermentativi poiché aumenta l'aria superficiale della matrice e apre le fibre vegetali rendendole più biodegradabili.

Descrizione del reattore di digestione anaerobica:

La sostanza organica così trattata viene sottoposta ad un primo trattamento di fermentazione anaerobica all'interno di reattori modulari discontinui sviluppati da BAKON Energy Technologies GmbH & Co. KG.

Il processo è di tipo wet-dry, utilizza cioè sostanza organica con contenuto di solidi maggiore del 20%; in questo caso particolare l'impianto arriva a trattare biomassa con un contenuto di S.T. fino al 50%.

I reattori sono 11, formati da una struttura in cemento armato dotata di circuito di riscaldamento. Il carico e scarico della biocella si effettua mediante l'apertura di un portellone a tenuta stagna (Figura 27).



Figura 27: portelloni a tenuta stagna in entrata alle biocelle.

Il biogas prodotto viene recuperato dalla testa del reattore. Il percolato invece viene convogliato in una cisterna e ricircolato, irrorando dall'alto la massa di rifiuti presenti nel reattore. L'impianto è anche dotato di sistemi per la rilevazione in continuo di parametri di processo quali temperatura, quantità di percolato ricircolate, composizione e quantità del gas prodotto in uscita (Figura 28)

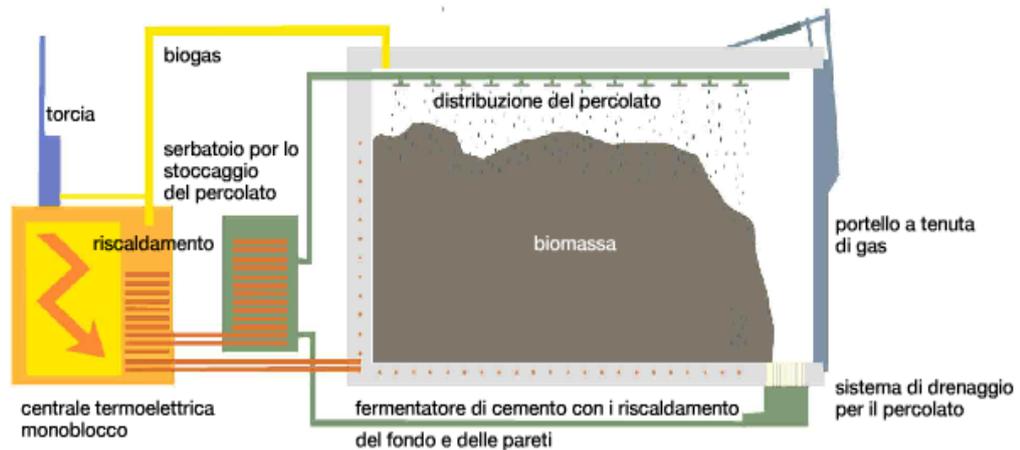


Figura 28: rappresentazione schematica di una biocella

il gas prodotto viene convogliato a due motori a combustione interna e bruciato con produzione di energia elettrica. Parte del calore e dell'energia sviluppata viene utilizzata per il riscaldamento del reattore.

Su undici biocelle dieci hanno il ricircolo del percolato in comune, mentre l'ultima ha un sistema autonomo e può essere usata per effettuare delle prove studio.

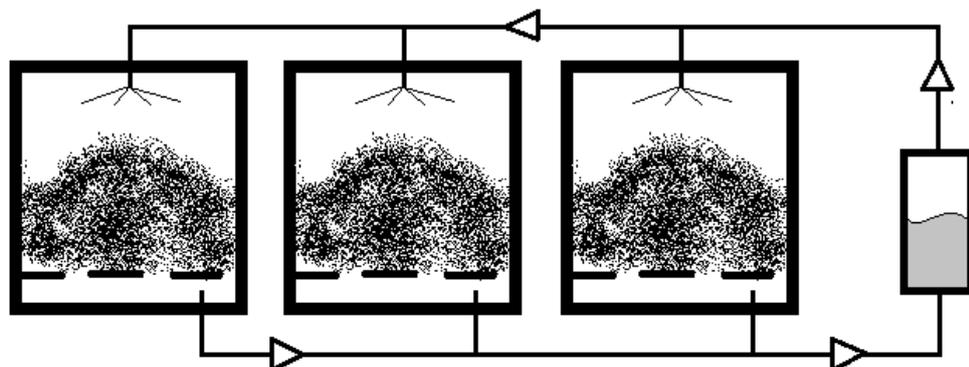


Figura 29: rappresentazione schematica di biocelle con ricircolo del percolato in comune

La sostanza organica presente all'interno della cella non subisce movimentazioni o rimescolamenti, è quindi un ambiente statico.

Il tempo di permanenza all'interno del reattore è di 28-30 giorni, ai termine dei quali si estrae metà della biomassa esausta e si aggiunge rifiuto fresco. L'altra metà della sostanza organica fermentata viene rimescolata assieme a quella fresca e funge da inoculo.

La temperatura di esercizio è di 37-40°C, ovvero lavora in condizioni mesofile.

In questa fase si produce biogas con un elevata concentrazione di metano (55-60%).

Tabella 50: dati di gestione dell'impianto nell'anno 2010 per l'azienda Romagna Compost

quantità di rifiuti trattati	compost prodotto	biogas prodotto	energia elettrica generata
T	t	m ³	KWh
35306	2377,68	2645956	5247501

Il biodigestato in uscita dalle celle viene adagiato in corsie aerate per un ulteriore stabilizzazione e maturazione del compost prodotto. Alla fine del trattamento aerobico il compost viene sottoposto a vagliatura per eliminare eventuali materiali indesiderati.

Il prodotto ottenuto deve sottostare a precisi limiti imposti dalla legge per poter essere venduto come ammendante (Figura 30).

Parametri	unità di misura	Compost prodotto	valori limite di legge(DLgs 75/2010) Ammendante compostato misto
Umidità	%	38,78	< 50
pH	(-)	8,15	6 – 8,5
C organico	% ss	22,08	> 20
C umico e fulvico	% ss	13,44	> 7
N organico sul secco	% Ntot	90,57	> 80
C/N	(-)	12,97	<25
Salinità	dS/m	2,88	Da dichiarare
Plastica vetro e metalli ≥ 2mm	% ss	0,13	< 0,5
Inerti litoidi ≥ 5 mm	% ss	0,43	< 5
Salmonelle in 25 g di t.q.		assenti	Assenti
Escherichia coli in 1g di t.q.	CFU/g	800	< 1000
Indice di germinazione diluito al 30 %	%	94,33	≥ 60
Cadmio	mg/kg ss	0,063	1,5
Rame	mg/kg ss	55,88	230
Nichel	mg/kg ss	12,77	100
Piombo	mg/kg ss	14,51	140
Zinco	mg/kg ss	108,66	500
Mercurio	mg/kg ss	0,13	1,5
Cromo totale	mg/kg ss	35,65	70
Cromo esavalente	mg/kg ss	0,01	0,5

Figura 30: caratteristiche del compost prodotto in azienda confrontato con i valori richiesti per legge.

5.1 Possibilità di applicazione di pretrattamenti enzimatici:

in questo tipo di impianto è teoricamente possibile mettere in atto i pretrattamenti enzimatici studiati, aggiungendo il preparato enzimatico nel by-pass del circuito del percolato, in modo che venga irrorato sulla massa del rifiuto mediante il ricircolo. Il ricircolo di percolato è essenziale per garantire la costante umidità della biomassa di rifiuto da cui la produzione del biogas è strettamente dipendente.

L'enzima così veicolato sarebbe direttamente irrorato sul cumulo agevolando l'idrolisi della matrice vegetale ed eventualmente in parte recuperato dalla raccolta del percolato stesso dalla biocella.

I possibili vantaggi ricavabili dall'attuazione di pretrattamenti enzimatici idrolitici sono l'aumento della produzione di biogas e la diminuzione dei tempi di residenza del rifiuto all'interno del reattore che sarebbe molto interessante per

trattare una maggiore quantità di rifiuti senza aumentare il volume dei reattori. Bioreattori più piccoli ad alta produttività potrebbe risultare strategici per una localizzazione micro-distribuita degli impianti.

5.2 Bilancio economico dei pretrattamenti enzimatici

L'utilizzo di enzimi commerciali da aggiungere al processo potrebbe costituire un costo insostenibile per la produzione di biogas. Sulla base dei nostri dati preliminari, è stata fatta una simulazione sul costo aggiuntivo dovuto al trattamento enzimatico in linea. Questa soluzione tecnica rende possibile portare al minimo i costi di investimento per l'adeguamento dell'impianto per cui possiamo conteggiare soltanto l'effetto del costo del preparato enzimatico.

Conoscendo il rapporto enzima/substrato è possibile calcolare le quantità di enzima commerciale da aggiungere al circuito del percolato.

La quantità di rifiuto trattata annualmente dall'impianto è di 35.306 tonnellate e il rapporto enzima substrato è 1/100. Facendo il calcolo si ottiene:

$$35306 \times 0,01 = 353 \text{ tonnellate di enzima}$$

Il costo dell'enzima commerciale è di circa 5 € al Kg, ovvero 5.000 € alla tonnellata. Facendo una semplice operazione si calcola il costo annuale del pretrattamento:

$$353 \text{ tonn} \times 5.000 = 1.765.000 \text{ euro}$$

Perché l'uso dell'enzima sia conveniente il guadagno dato dall'aumento della produzione di biogas deve quindi essere superiore a 1,8 milioni di euro.

Considerando che la produzione di energia elettrica dell'azienda in un anno di esercizio è di 5.247.501 kWh e sapendo che il prezzo di vendita di un kWh da energia rinnovabile, secondo la tariffa onnicomprensiva per impianti con potenza installata non superiore ad 1 MW, è di circa 0,28 euro³³, è possibile stimare il guadagno annuo derivante dalla cessione dell'energia a 1.470.000 euro.

E' quindi evidente che l'utilizzo di enzimi industriali può risultare conveniente soltanto se la quantità di preparato enzimatico aggiunta non eccede 0,2 - 0,8 kg

(enzima)/ton di biomassa rispetto a circa 10 kg/ton dei nostri esperimenti di laboratorio.

Ne consegue che, con queste proporzioni, l'attività enzimatica nei bioreattori da laboratorio si ridurrebbe di almeno 100 volte, portando gli effetti del trattamento enzimatico da 200-300 minuti a 500 ore cioè circa 20 giorni di fermentazione. Un tempo di residenza più lungo è comunque compatibile con i tempi di fermentazione che sono dell'ordine di 28-30 giorni. L'aumento dei costi dovrebbe essere ampiamente coperto dall'aumento di resa di biogas almeno del 20% che potrebbe portare a regime la produzione di energia elettrica annuale a oltre 6 milioni di kWh e prossima ai 7 milioni di kWh tipici di un analogo impianto alimentato a insilato di mais da 1 MW di potenza elettrica.

6 CONCLUSIONI

In questo elaborato si sono approfonditi gli aspetti relativi alla valorizzazione degli scarti agro alimentari presenti all'interno dei rifiuti solidi urbani. Lo smaltimento della FORSU (frazione organica da RSU) in impianti di fermentazione anaerobica sta diventando sempre più diffuso in quanto adempie a due necessità: quella di smaltire un rifiuto altrimenti inquinante, e quella di produrre energia rinnovabile grazie al biogas sintetizzato dai microorganismi.

In particolare si è studiato il processo biochimico di produzione di biogas, individuandone la criticità nella prima fase idrolitica. Si è cercato quindi di ottimizzare l'idrolisi della sostanza organica in ambiente anaerobico mediante l'uso di preparati enzimatici commerciali.

L'intera sperimentazione è stata preceduta da una ricerca bibliografica atta a definire la composizione merceologica della FORSU al fine di poter realizzare un modello di FORSU da utilizzare in laboratorio. Dai dati di produzione di rifiuti, incrociati con i dati di consumi alimentari, si sono ottenute le percentuali medie di scarto per ogni categoria alimentare presa in esame che sono state utilizzate per formulare lo scarto organico modello. La scelta degli alimenti da è stata fatta arbitrariamente, ma seguendo un principio di disponibilità e diffusione nella dieta italiana. Sono stati presi i cibi comuni e meno soggetti alla variabilità stagionale come pasta, biscotti, pane, carota, patata, mela, pesca, fagiolini e insalata.

Sono stati presi in esame due tipi di pretrattamenti enzimatici, uno su matrici grasse e oleose mediante l'utilizzo di lipasi e l'altro su matrici ligno-cellulosiche mediante l'impiego di appositi enzimi commerciali. Nello studio dei trattamenti idrolitici con lipasi si è messo a punto un nuovo metodo per la determinazione dell'attività lipasica,. Il nuovo metodo ha risolto alcune problematiche riscontrate nei precedenti che erano legate principalmente alla disomogeneità delle condizioni di reazione. In maniera particolare sia l'utilizzo di un co-solvente, come la dimetilformammide, per il substrato di reazione poco solubile in acqua,

come il metilmiristato, che l'utilizzo di ottimizzate condizioni di estrazione del prodotto (acido miristico) hanno permesso di migliorare notevolmente la sensibilità del saggio. Tuttavia, per mancanza di tempo, non si è riusciti ad applicare l'attività lipasica in una sperimentazione su substrati alimentari.

Nello studio su matrici ligno-cellulosiche invece si sono prima caratterizzati alcuni enzimi commerciali, come Accellerase 1500 e i suoi complementi: BG, XC e XY , sottoponendoli a misure di attività amilasica, xilanasica e pectinasica a due diverse temperature, 50 e 60°C. .

Da questa caratterizzazione è risultato che le attività amilasiche e pectinasiche di tutti e quattro gli enzimi sono piuttosto basse rispetto all'attività xilanasica degli enzimi XY e XC. L'attività amilasica più forte è stata riscontrata nei preparati enzimatici Accellerase e BG, mentre quella pectinasica nei preparati XC e Accelerase.

Dopo questa caratterizzazione si è passati alla sperimentazione valutando l'azione dell'enzima Accelerase su singoli alimenti costituenti la FORSU modello.

L'azione dell'enzima risulta marcata solo su quei substrati facilmente aggredibili quali pasta, biscotti e pane. La patata, che presenta anch'essa un elevato contenuto amidaceo, risulta aggredibile solo dopo cottura.

Per fagiolini, insalata, pomodori mela e pesca, infatti, non si riscontrano incrementi consistenti nella concentrazione di zuccheri riducenti rilasciati in soluzione, sintomo di una ridotta attività enzimatica tipica per l'idrolisi di substrati ricchi di fibre pectiche. Particolare rilevanza è stata data all'effetto della cottura dei cibi e si è generalmente osservato che la cottura delle matrici amidacee favorisce l'azione enzimatica a differenza di quanto avviene per le fibre pectiche

Infatti, la gelificazione della pectina per effetto della cottura porta a un consistente coordinamento dell'acqua sulla fibra formando una barriera che funge da azione di protezione all'attacco enzimatico.

Dopo aver testato l'azione dell'enzima sui singoli alimenti si è ricostruito un campione di FORSU modello basandosi sugli studi di composizione merceologica effettuati in precedenza. Il campione così costruito è stato sottoposto ad analisi seguendo la stessa metodica utilizzata per i singoli alimenti.

Dalle elaborazioni effettuate sui risultati ottenuti si evince che l'aumento di zuccheri registrato nell'analisi del campione di FORSU è principalmente dovuto alla degradazione della pasta (99,3%).

Ne consegue che i restati alimenti presenti non sembrano subire degradazioni significative, coerentemente con quanto osservato dalle specifiche reazioni sui singoli substrati. Tale risultato sembra dimostrare una scarsa influenza di azioni sinergiche e/o inibitorie delle diverse matrici che compongono la FORSU modello.

Il contributo dei pretrattamenti enzimatici sulla frazione amidacea è comunque strettamente dipendente dalla tipologia di preparati enzimatici utilizzati che richiede evidentemente un ulteriore approfondimento attraverso l'utilizzo di attività enzimatiche pectinasiche, sebbene rimanga palese la maggiore difficoltà nell'idrolizzare le frazioni pectiche delle strutture vegetali.

Oltre che su alimenti l'enzima è stato testato anche su composti non alimentari che possono comunque andare a far parte della FORSU, quali i sacchetti di plastica biodegradabili (MaterBi) e carta. Su questi substrati l'enzima ha agito efficacemente, con un incremento consistente degli zuccheri liberi in entrambi i campioni. Il MaterBi viene degradato similmente agli altri substrati amidacei presi in esame in quanto è composto prevalentemente da amido di mais modificato e reso plastico, coerentemente con quanto osservato nelle prove sui campioni di FORSU modello.

Per l'analisi sulla cellulosa, l'enzima più efficace è risultato essere l'Accellerase, nel quale si è riscontrata anche una disgregazione fisica del campione in esame, segno di una marcata attività su questo substrato.

Campo di applicazione della ricerca:

In conclusione a questo lavoro di tesi abbiamo cercato di contestualizzare la sperimentazione per una possibile applicazione in campo industriale grazie alla collaborazione con l'azienda Romagna Compost di Cesena.

L'azienda utilizza un tipo di reattore batch con fermentazione "wet-dry" per il trattamento di frazioni organiche derivanti da raccolta differenziata per la produzione di energia elettrica da biogas.

E' stata, quindi, studiata la struttura dell'impianto industriale esistente al fine di verificare il modo migliore per effettuare un pretrattamento enzimatici sulla biomassa senza apportare costose modificazioni strutturali. La soluzione adottata è quella di aggiungere direttamente il preparato enzimatico nel by-pass del circuito del percolato, in modo che venga irrorato sulla massa del rifiuto mediante il ricircolo.

I possibili vantaggi per l'azienda potrebbero essere un aumento della produzione di biogas e la riduzione dei tempi di permanenza della sostanza organica all'interno del reattore. La diminuzione dei tempi di residenza in particolare può portare a un aumento della produttività del reattore, rendendo possibile l'installazione di piccoli impianti micro distribuiti sul territorio che smaltiscano localmente il rifiuto organico prodotto in zona. Limitare il trasporto dei rifiuti riduce i costi di gestione del servizio e le emissioni di anidride carbonica in atmosfera e per questo può risultare molto interessante in un ottica di gestione integrata del territorio.

Allo stato attuale, la valutazione economica del processo ha messo in evidenza un costo insostenibile per la produzione di biogas.

Da queste elaborazioni si può dedurre che il processo di pretrattamento enzimatico può essere conveniente solo se si riducono le quantità di enzima utilizzate da 10 Kg/ton, utilizzate in sede di sperimentazione, a 0,2 - 0,8 Kg/ton. Una diminuzione di dieci volte della quantità di enzima utilizzato comporta una

riduzione dell'attività all'interno del reattore, allungando i tempi di reazione da 300 minuti a 500 ore (20 giorni).

Un tempo di residenza di 20 giorni è compatibile con i tempi di fermentazione impiegati dall'impianto, che sono dell'ordine di 28-30 giorni.

Un aumento della resa di produzione di biogas di almeno il 20% potrebbe portare la produzione di energia elettrica annuale dell'impianto oltre i sei milioni di kWh e prossima ai 7 milioni di kWh tipici di un analogo impianto alimentato a insilato di mais da 1 MW di potenza elettrica.

7 BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ ISPRA: Rapporto Rifiuti Urbani 2011. www.isprambiente.gov.it
- ² G. Baroncini, "modello di pianificazione di servizi di raccolta differenziata, caso studio provincia Forlì-Cesena" tesi di laurea in tecnologie chimiche per l'ambiente e per la gestione dei rifiuti, anno 2008-2009, università di Bologna.
- ³ <http://www.chimicare.org>
- ⁴ J. K. C. Rose "The plant cell wall", annual plant reviews, vol.8, CRC press, pag 1-37.
- ⁵ T.W. Graham Solomons, "chimica organica", Zanichelli, pag. 933-934
- ⁶ Ronald P. de Vries, Jaap Visser "Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides" *microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001, vol. 65, No.4, pag. 497-522
- ⁷ M. Brennan, P. J. Harris, "distribution of Fucosylated Xyloglucans among the walls of different cell types in monocotyledons determined by immunofluorescence microscopy", *Molecular plant*; No.1, vol. 4, pag. 144-156, (2011)
- ⁸ T.Nagodawithana, G.Reed, "Enzyme in food processing", third edition, Elsevier science and technologies, pag. 135
- ⁹ www.chimica.unipd.it
- ¹⁰ P. K. Gupta, "cell and molecular biology", pag. 76, (2005)
- ¹¹ D. J. Cosgrove, "assembly and enlargement of the primary cell wall in plants". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997, vol. 13, pag 171-201
- ¹² <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>
- ¹³ W.Aehle, "enzymes in industry: production and application", second edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- ¹⁴ A.F. D'aprile, "trattamento enzimatico della frazione organica dei rifiuti solidi urbani per la produzione di biogas", tesi di laurea in chimica industriale, università di Bologna, anno 2004/2005.

-
- ¹⁵ M.C. Marin-Rodriguez, J. Orchard, G.B. Seymour, "pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening", *Journal of experimental botany*, vol. 53, no. 377, pag. 2115-2119.
- ¹⁶ T.D. Brook, M.D. Madigan, "microbiologia", città studi edizioni.
- ¹⁷ C. ratledge, B. Kristiansen, "biotecnologie di base", Zanichelli.
- ¹⁸ R. Vismara, F. Malpei, M. Centemero, "BIOGAS da rifiuti solidi urbani", energie; pag 53-65.
- ¹⁹ C. Caramiello, "possibili interazioni rifiuto-metano: emissioni diffuse da discarica e biometanazione da biomasse territorialmente significative" dottorato di ricerca in analisi dei sistemi ambientali, Università Federico II di Napoli.
- ²⁰ F. Cecchi, P. Battistoni, P. Pavan, D. Bolzonella, L. Innocenti, "digestione anaerobica della frazione organica dei rifiuti solidi. Aspetti fondamentali, progettuali, gestionali, di impatto ambientale ed integrazione con la depurazione delle acque reflue" Edizioni APAT, manuali e linee guida 13/2005, Roma. Pagine 178.
- ²¹ A. Bassetti, U. Barbaresi, F. Cecchi "processo di digestione anaerobica termofila di residui organici in fase semi-solida". Brevetto MI 91 000777. (1991)
- ²² G. Lissens, P. Vandevivere, L. De Baere, E.M. Bley, W. Vestraete, "Solid waste digestors: process performance and practice for municipal solid waste digestion", *Water Science and Technology*, vol. 44, n. 8, pag. 91-102, anno 2001
- ²³ <http://www.wtert.eu>
- ²⁴ M. J. Bailey, P. Biely, K. Poutanen, "Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity", *Journal of Biotechnology*, n. 23, pag. 257-270 (1992)
- ²⁵ R. Lowry, Ian J. Tinsley, "Rapid Colorimetric Determination of free Fatty Acids", Technical paper n. 4036, Oregon Agricultural Experiment Station. (1969)
- ²⁶ P. Pinsirom, K. L. Parkin, "Current Protocols in Food Analytical Chemistry". Lipase Assays. 2001.
- ²⁷ N. D'Andrea, "valorizzazione integrate degli scarti dell'industria olearia: pre-trattamento enzimatico tramite lipasi da *Aspergillus Oryzae*" tesi di laurea in chimica industriale, anno 2005, università di Bologna.

²⁸ www.inran.it

²⁹ A. Pollettini, R. Pomi, “messa a punto di un sistema di co-digestione anaerobica di FORSU e fanghi di depurazione di acque reflue urbane”, report RdS/2010/174

³⁰ www.sinu.it

³¹ J. Adrian, J.Portus, R. Frangne, “dizionario degli alimenti, scienza e tecnica”, tecniche nuove; pag. 235

³² www.romagnacompost.it

³³ www.gse.it