



## PRODUZIONE DI TRIACILGLICEROLI MEDIANTE MICROALGHE ALIMENTATE CON SCARTI AGRO-INDUSTRIALI

*Le alghe non sono solo una fonte di materie prime e ingredienti per le produzioni alimentari, cosmetiche e farmaceutiche, ma sono anche una importante fonte rinnovabile ed ecologica da cui ricavare combustibile, in particolare biodiesel. Un altro esempio di come ricerca accademica e industriale possono lavorare in sinergia.*

**\* Igor Anfelli**

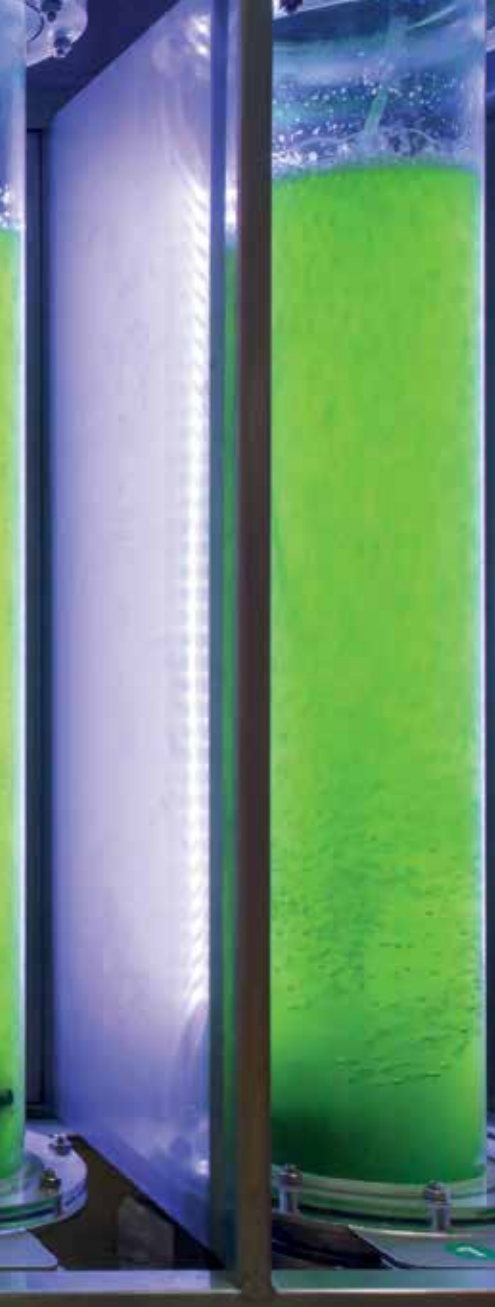
**O**biiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di analizzare la produzione di lipidi da parte di microalghe in presenza di sostanze zuccherine come fonte di carbonio organico in condizioni di buio. In partico-

lare, sono state testate sostanze “pure” e sottoprodotti di scarto derivanti dall’industria agroalimentare. La specie di microalga utilizzata è stata fornita dall’azienda Teregroup/Algamoil, presso la quale è stato svolto il tirocinio.

Sono state testate diverse sostanze pure ritrovate in letteratura

come migliori fonti di carbonio per favorire l’accumulo di lipidi.

Le sostanze che hanno dato i risultati migliori sono poi state analizzate, selezionate e ricercate all’interno di reflui e di sottoprodotti di scarto dell’industria agroindustriale in particolare casearia, enologica e della produzione di biodiesel.



triacilgliceroli.

Gli oli immagazzinati dalla biomassa algale sono stati infine estratti, caratterizzati e analizzati per la produzione di biodiesel.

### Biodiesel

Biodiesel (dal greco, *bios* vita + diesel da Rudolf Diesel) si riferisce a una varietà di combustibili a base di esteri monoalchilici di acidi grassi a lunga catena, prodotti da oli e grassi rinnovabili.

Il biodiesel è tipicamente prodotto attraverso la reazione di transesterificazione, che consiste nel trattare un olio vegetale o un grasso animale con metanolo o etanolo in presenza di un catalizzatore per produrre metil- o etil- esteri (biodiesel) e glicerolo (Demirbas, 2002). Generalmente, il metanolo viene preferito all'etanolo per la transesterificazione perché meno costoso (Graboski e McCormick, 1998).

Il biodiesel si presenta come un biocombustibile liquido, di colore ambrato, con una viscosità simile a quella del gasolio per autotrazione ottenuto per distillazione frazionata del petrolio grezzo. Il biodiesel ha un numero di cetano superiore a quello del gasolio, si incendia quindi più facilmente quando viene iniettato nel motore. Rispetto al gasolio, il biodiesel non è esplosivo (ha un flash point a 150 °C, il gasolio a 64 °C), è biodegradabile e non tossico, e riduce significativamente le emissioni tossiche quando viene bruciato come combustibile.

Il biodiesel può essere mescolato con il gasolio in ogni proporzione

e impiegato nei moderni motori diesel, anche se alcuni autoveicoli di fabbricazione meno recente possono subire una degradazione di tubi e giunti in gomma per via del maggior potere solvente rispetto al gasolio tradizionale: in questo caso, la gomma sciolta dal biodiesel può poi formare depositi o intasare le linee dell'alimentazione del veicolo. L'adozione di gomme più resistenti nei veicoli di recente fabbricazione (dal 1992 in poi) potrebbe risolvere questo inconveniente; inoltre, il maggior potere solvente del biodiesel aiuta a mantenere pulito il motore sciogliendo residui eventualmente presenti.

Dal punto di vista ambientale, il biodiesel presenta alcune differenze rispetto al gasolio:

- riduce le emissioni nette di monossido di carbonio (CO) del 50% circa e di biossido di carbonio del 78,5% circa, perché, il carbonio generatosi durante la combustione è pari a quello fissato dagli organismi vegetali durante la crescita;
- non contiene idrocarburi aromatici; le emissioni di idrocarburi aromatici ad anelli condensati (per esempio benzopireni) sono ridotti fino al 71%;
- non contenendo zolfo le matrici di partenza, le emissioni di diossido di zolfo (SO<sub>2</sub>) sono pari a zero;
- riduce l'emissione di polveri sottili fino al 65%;
- produce, però, più emissioni di ossidi di azoto (NO<sub>x</sub>) del gasolio, inconveniente questo che può essere contenuto riprogettando i motori diesel e dotando gli scarichi di appositi catalizzatori.

Sono stati valutati i parametri di crescita e di produzione percentuale di oli all'interno di questi reflui al fine di stabilire quali siano le condizioni e le concentrazioni favorevoli all'accumulo di

- Produzione saponette vegetali 100% personalizzate per erboristerie, profumerie, farmacie
- Saponette da Hotel
- Produzione di cosmetici
- Lavorazione c/o terzi

**ALCHIMIA SOAP SRL**

**Alchimia Soap Srl**  
Via Mantova, 5  
21057 Olgiate Olona (VA)  
Tel.: 0331631582  
Fax: 0331674574  
www.alchimiasoap.it  
soap@alchimiasoap.it

### LA NORMATIVA EUROPEA

Il Parlamento Europeo a Strasburgo ha adottato nel settembre 2013 nuove regole per stabilire un tetto all'utilizzo di biocarburanti tradizionali e un passaggio rapido a nuovi biocarburanti ricavati da fonti alternative, quali microalghe e rifiuti. Queste misure mirano a ridurre le emissioni di gas a effetto serra dovute al crescente utilizzo dei terreni agricoli per la produzione di colture di biocarburanti.

"...Tetto massimo del 6% al 2020 sul totale dei consumi energetici nei trasporti per i biocarburanti di prima generazione, quota minima del 2,5% per quelli di seconda generazione (alghe) ...". Queste le modifiche alle direttive 98/70 (Qualità della benzina e del combustibile diesel) e 2009/28 (Fonti rinnovabili) approvate dal Parlamento Europeo.

I principali vantaggi di utilizzo di biomassa algale per ricavare biodiesel da microalghe sono elencati di seguito:

- i biocarburanti da microalghe sono risultati essere non tossici, altamente biodegradabili e privi di solfuri;
- le microalghe, consumando quantità consistenti di CO<sub>2</sub> per la crescita, possono essere utilizzate come biofiltro per la cattura dei gas serra (GHG) o dei gas esausti in uscita dagli impianti industriali;
- le microalghe possono essere coltivate in acque reflue industriali, in acque fortemente alcaline e in acque reflue fognarie, contribuendo in tal modo, non solo alla produzione di biomassa, ma anche alla riduzione e al controllo all'inquinamento ambientale;
- le alghe possono, inoltre, essere economicamente convertite in combustibili solidi, gassosi, quale metano, o bioetanolo (Demirbas, 2005).

### Microalghe e tecniche di coltivazione

Le microalghe sono organismi unicellulari fotosintetici capaci di vivere sia in ambienti terrestri sia in ambienti acquatici, marini o d'acqua dolce. Il loro meccanismo fotosintetico è simile a quello

delle piante terrestri ma, a causa di una struttura cellulare più semplice e al fatto stesso di trovarsi direttamente immerse in un ambiente acquoso, dove hanno quindi più efficiente accesso ad acqua e altri nutrienti, sono generalmente più efficienti nel convertire l'energia solare in biomassa. L'assenza di strutture non-fotosintetiche di supporto (radici, fusti, ecc.) favorisce inoltre la loro coltivazione *in vitro*, per esempio in fotobioreattori.

#### Autotrofia

Le crescita di microalghe in autotrofia consiste nell'utilizzo della luce solare come fonte di energia e dell'anidride carbonica come fonte di carbonio inorganico per produrre energia chimica attraverso il processo di fotosintesi (Huang *et al.*, 2010).

Questa è la condizione di coltivazione più usata per la crescita delle microalghe, nelle quali il contenuto di lipidi può variare dal 5% al 68% in base alla specie usata. Spesso, però, il massimo contenuto lipidico che si può ottenere è a scapito della produttività di biomassa che, irrimediabilmente, si abbassa. Quindi nella scelta della migliore microalga nella produzione di oli, bisogna tener conto non solo del-

la capacità di accumulare elevate quantità di lipidi, ma anche della produttività di biomassa.

Il maggior vantaggio della coltivazione in autotrofia è l'utilizzo di CO<sub>2</sub> come unica fonte di carbonio per la produzione di energia, lipidi e biomassa; inoltre il rischio di contaminazioni è molto basso (Mata *et al.*, 2010).

#### Eterotrofia

Alcune specie di microalghe possono crescere non solo in condizioni di autotrofia, ma anche in condizioni di buio utilizzando fonti di carbonio organico, così come avviene in molti batteri.

La condizione in cui le microalghe utilizzano carbonio organico sia come fonte di energia sia come fonte di carbonio è chiamata coltivazione in eterotrofia (Chojnacka e Marquez-Rocha, 2004). Questo tipo di coltivazione può risolvere il problema associato alla limitata filtrazione di luce attraverso la coltura di microalghe dovuta all'elevata concentrazione cellulare nei fotobioreattori durante la coltivazione in autotrofia (Huang *et al.*, 2010), permettendo di ottenere maggiore produzione e produttività di biomassa. Alcune specie di microalghe mostrano inoltre un maggior contenuto di lipidi durante la crescita in eterotrofia. Tra queste specie spicca *Chlorella protothecooides*, la quale passando da una coltivazione autotrofa a eterotrofa può avere un incremento del contenuto di lipidi fino al 40% (Xu *et al.*, 2006).

Le microalghe possono utilizzare svariate fonti di carbonio organico, come glucosio, glicerolo, saccarosio, lattosio, acetato; ciascuna di queste sostanze può essere riscontrata in materiali di scarto agroalimentare. Questo metodo di coltivazione tuttavia, utilizzando per lo più zuccheri come fonte di carbonio, può avere dei problemi legati alla contaminazione.

### Mixotrofia

La coltivazione in mixotrofia avviene quando le microalghe all'interno di un fotobioreattore si trovano in contatto anche con una fonte di carbonio organico; quindi la microalga utilizzerà sia il carbonio inorganico sia il carbonio organico per la produzione di biomassa. Questo significa che queste microalghe sono in grado di adattarsi sia in condizioni di autotrofia che di eterotrofia. Il vantaggio fondamentale riguarda la respirazione che queste microalghe attuano, in quanto, utilizzando la fonte di carbonio organico produrranno come scarto la CO<sub>2</sub> che può essere recuperata come fonte di carbonio inorganico per le coltivazioni autotrofe. (Mata *et al.*, 2010).

Comparata con la coltivazione autotrofa e eterotrofa, la coltivazione in mixotrofia, però, è usata raramente per la produzione di oli da microalghe.

### Fasi di crescita

La crescita delle microalghe avviene in cinque fasi principali:

1) Fase di latenza (o fase lag): in questa fase si riscontra un rapido consumo dei nutrienti dovuto al veloce metabolismo delle microalghe, seguito da un lento aumento del numero di cellule. Si tratta di una fase di adattamento della coltura alle nuove condizioni in cui essa è posta a crescere.

2) Prima fase esponenziale: in questa fase la coltura inizia a presentare un certo adattamento alle condizioni sperimentali.

3) Fase esponenziale (o fase log): questa fase è caratterizzata da un'attiva proliferazione cellulare e il tasso di crescita è direttamente proporzionale alle condizioni di crescita (concentrazione nutrienti, illuminazione, temperatura, pH).

4) Fase stazionaria: durante questa fase non si osserva un signifi-

ficativo aumento del numero di cellule, dovuto all'esaurimento dei nutrienti e al progressivo accumulo nel mezzo di coltura di metaboliti primari e secondari; il numero di cellule in generazione è uguale al numero di cellule che muoiono.

5) Fase di morte cellulare: in questa fase la vitalità delle cellule si presenta compromessa. Il numero di cellule morte è maggiore del numero di cellule che si generano.

### Sistemi di coltivazione

La tipologia del sistema di coltura gioca un ruolo molto importante nella determinazione del successo

di un processo industriale di coltivazione delle microalghe.

Un sistema di coltura efficiente deve rispondere alle seguenti caratteristiche:

- essere dotato di illuminazione efficace;
- realizzare un ottimale trasferimento gas-liquido;
- essere di facile operatività;
- mantenere bassi livelli di contaminazione;
- richiedere bassi costi di impianto e di esercizio;

Le due tipologie di reattori utilizzati per la coltivazione delle microalghe sono gli open ponds (chiamati anche raceway ponds,



**Hai bisogno di energia?  
Caricati con**

**Dr. Niedermaier®  
Regulat Italia**

**Regulatpro®  
Bio**

Bio-concentrato  
Bipolare fermentato  
a cascata

energia  
diffesa immunitaria  
vitalità

energia  
diffesa immunitaria  
vitalità

**Si trova in tutte le farmacie  
e nelle migliori erboristerie**

**Segui le offerte sul nostro sito!**

Tel. +39 0473 231 669 | [info@regulat.it](mailto:info@regulat.it) | [www.regulat.it](http://www.regulat.it)

sistemi aperti) e i fotobioreattori. *Open ponds*: sono i sistemi più antichi e semplici per la coltivazione di massa di microalghe. Questi cosiddetti “sistemi aperti” sono costituiti da una vasca in cui una pala rotante viene azionata per evitare la sedimentazione della biomassa e la CO<sub>2</sub> viene insufflata dal basso del reattore, per essere utilizzata dalle alghe come fonte di carbonio. I punti di forza di questo sistema sono la semplicità di operabilità e il basso consumo energetico che ne consegue; per quanto riguarda gli svantaggi, essendo un sistema aperto, vi saranno alti livelli di contaminazione da parte di microrganismi indesiderati che possono minare la sopravvivenza delle microalghe. Inoltre, la consistente perdita d'acqua causata dal fenomeno di evaporazione è un altro svantaggio da non trascurare. Per quanto riguarda il controllo, essendo un sistema aperto, sarà difficilmente controllabile e quindi alla mercé delle condizioni atmosferiche che andranno a influenzare soprattutto illuminazione e temperatura. (Halim, Danquah, and Webley 2012).

*Fotobioreattori*: sono sistemi di coltivazione chiusi e quindi controllati, sviluppati per superare i limiti dei sistemi aperti.

Ne esistono di vari tipi: reattori tubulari, flat-plate, colonne verticali. Il vantaggio principale di questi bioreattori è la possibilità di lavorare in sistemi chiusi, il che permette la coltivazione di un singolo ceppo di microalga in condizioni di crescita ottimali e costanti. Solitamente si utilizzano materiali trasparenti per massimizzare la penetrazione dei raggi solari e quindi avere un'irradiazione della coltura quasi costante su tutto il volume.

I fotobioreattori sono i sistemi di coltivazione di microalghe scelti per l'attività di ricerca in labo-

ratorio e per la valutazione di prodotti ad alto valore aggiunto, necessaria prima dello scale up. A livello industriale, però, presentano non pochi svantaggi, legati soprattutto al dispendio di energia.

### Specie di microalga utilizzata

Gran parte dell'interesse per le microalghe eucariotiche, in particolare sulla loro capacità di produrre lipidi e di biorisanamento, è concentrato sui generi oleaginosi, come *Chlorella*. Tali generi possono accumulare più del 25% del loro peso secco in lipidi e sono in grado di metabolizzare fonti di carbonio organiche, incrementando ulteriormente il contenuto lipidico su peso secco.

La specie di *Chlorella* utilizzata durante la fase sperimentale, che nel corso del lavoro indicheremo come C004, è una microalga capace di crescere sia in condizioni di autotrofia che in condizioni di eterotrofia.

La crescita in eterotrofia è favorita dall'utilizzo di diverse fonti di carbonio, come glucosio, acetato e glicerolo; i quali favoriscono un incremento della produzione e dell'accumulo di lipidi (Endo *et al.*, 1977; Wu *et al.*, 1994).

A tal proposito, la biomassa esausta (da post eliminazione acqua ed estrazione oli) della specie C004 si è rivelata essere un'importante fonte in molti prodotti, come mangimi per l'acquacoltura, integratori alimentari umani e prodotti farmaceutici (Kyle, 1992; Corriere *et al.*, 1994; Borowitzka, 1995; Chen, 1996), ma è anche stata individuata come un ottimo candidato per la produzione di biodiesel (Wu *et al.*, 1992; Wen *et al.*, 2002 Miao e Wu, 2004).

### Processo produttivo e scarti agro-industriali

Il processo di produzione dei tria-

cilgliceroli (TAG) inizia con una prima fase di accrescimento cellulare in autotrofia all'interno di fotobioreattori tubulari verticali, insufflando un flusso costante di aria arricchita in CO<sub>2</sub> e a illuminazione controllata.

Al raggiungimento di una determinata concentrazione cellulare, la biomassa algale viene centrifugata e risospesa all'interno di fermentatori chiusi in assenza di luce e con all'interno una fonte di carbonio organico.

Questa metodica è utilizzata per fare in modo che le cellule microalgali interrompano il metabolismo autotrofo, incentrato sulla crescita, e mettano in atto quello eterotrofo, adibito alla produzione e immagazzinamento dei lipidi.

La fonte di carbonio organica è stata scelta tra reflui e prodotti di scarto dell'industria, in particolare, casearia, enologica e dalla produzione di biodiesel.

### Scarti caseari

I prodotti che, in aggiunta alla produzione principale si originano dall'industria della caseificazione, sono gli effluenti e i sotto-prodotti dei processi di lavorazione; fra questi i principali sono il latticello, la scotta e l'acqua di filatura.

Le loro caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche sono estremamente variabili, in rapporto soprattutto alla tipologia di prodotto e alle dimensioni dell'industria.

#### Latticello

Questo sottoprodotto di scarto deriva dalla lavorazione e produzione del burro e, come il siero ottenuto nella produzione del formaggio, si crea dalla coagulazione della caseina. Rispetto al siero, tuttavia, è più acido e meno ricco di lattosio. In tabella 1 è riportata la composizione media del latticello.

Sostanze Presenti	Valore Medio
pH	4.5-5.1
Grassi (%)	0.5-0.8
Proteina Totale (%)	3.3-3.5
SieroProteine (%)	0.6-0.7
Lattosio (%)	4.0-4.6
Sali (%)	0.7-0.9
Acidi Organici (%)	0.15-0.20
Caseina (%)	2.6-2.8

Tabella 1. Composizione media del latticello

### Scotta

Il siero ottenuto dalla separazione della ricotta, e che costituisce l'ultima fase delle lavorazioni casearie portando alla rimozione della maggior parte delle proteine ancora presenti in soluzione, prende il nome di scotta. Questo sottoprodotto è quindi impoverito di proteine, ma ricco in sali e acidi organici come l'acido lattico. In tabella 2 è riportata la composizione media della scotta.

Sostanze Presenti	Valori Medi
pH	5.6-6.2
Grassi (%)	0.15-0.30
Proteina Totale (%)	0.10-0.15
Lattosio (%)	4.0-4.6
Sali (%)	0.9-1.1
Acidi Organici (%)	0.20-0.25

Tabella 2. Composizione media della scotta

### Acqua di filatura

Questo refluo deriva dal residuo della fase di filatura della cagliata. Ha un elevato contenuto di NaCl,

Sostanze Presenti	Valore Medio
Solidi Sospesi Totali (%)	6.5
Lattosio (%)	4.4
Proteine (%)	0.75
Grassi (%)	0.06
Ceneri (%)	0.5
Sali (%)	1.5
pH	5.8

Tabella 3. Composizione media dell'acqua di filatura

acido citrico, acido lattico, ideali come fonti di carbonio organico da valorizzare. In tabella 3 è riportata la composizione media dell'acqua di filatura.

### Scarti enologici

La feccia è il residuo depositato dopo la fermentazione del vino, formato

principalmente da lieviti esausti che hanno terminato il loro ciclo vitale, tartrati e impurità derivate dell'uva (frammenti di buccia, di vinaccioli o di foglie verdi e secche). L'eliminazione della feccia dal vino attraverso la pratica dei travasi è fondamentale, in quanto, essendo di natura organica e quindi formata da cellule di varia natura, a contatto con l'alcol del vino, dà origine alla lisi delle membrane cellulari e quindi alla dispersione all'interno del vino di sostanze che, nella maggior parte dei casi, possono originare alterazioni organolettiche. Il primo lavaggio che viene fatto con semplice acqua può essere recuperato e riutilizzato come refluo valorizzabile, essendo presenti al suo interno ingenti quantità di fonti di carbonio organico utilizzabili dalle microalghe.

### Scarti industria del biodiesel

Il sottoprodotto principale della trasformazione dell'olio in biodiesel, ottenuto dal processo di transesterificazione, è la glicerina (prodotto commerciale contenente almeno il 95% di composto puro) o glicerolo (composto puro denominato anche 1,2,3-triossi-n-propa-no).

La glicerina è ottenuta in soluzione acquosa al 12-18% in cui è presente an-

che una piccola frazione di acidi grassi che normalmente vengono eliminati con acido cloridrico.

Questo scarto, definito anche glicerolo crudo, contiene una grande varietà di metalli che, uniti all'elevata concentrazione della fonte di carbonio organico, ne costituiscono un candidato eccellente per la crescita in eterotrofia delle microalghe.

## PROCESSI DI DOWNSTREAM

### Raccolta e concentrazione

All'interno di una coltura di microalghe, le cellule sono uniformemente disperse nel mezzo di coltura e altamente diluite in ambiente acquoso con concentrazioni di biomassa comprese tra 0,3% e 1,0% per quanto riguarda la crescita in autotrofia, e attorno all'11,6% per la crescita in eterotrofia. (Gouveia e Oliveira 2009; Wu Shi *et al.*, 2007).

Poiché i lipidi e gli altri prodotti sono confinati all'interno nella matrice cellulare, risulta necessario concentrare le alghe prima dell'estrazione del prodotto. Pertanto, la selezione del metodo di raccolta è cruciale. (Brennan e Owende 2010).

Diverse sono le tecniche utilizzate a tale scopo: sedimentazione, centrifugazione, flottazione, flocculazione.

### Sedimentazione

La sedimentazione è comunemente applicata nel trattamento delle acque reflue, separando la fase microalgale da quella acquosa sfruttando la forza di gravità. Essa risulta quindi tanto più efficace quanto più elevata è la densità delle particelle in sospensione rispetto alla densità del liquido che funge da solvente.

Un altro parametro che influisce

sulla decantazione è la dimensione delle particelle sospese: più sono piccole meno la decantazione risulta efficace. Questo è il motivo per cui la sedimentazione delle microalghe è un processo molto lento, in quanto possiedono una densità e una dimensione molto basse.

### *Centrifugazione*

Questo metodo risulta il più opportuno per la separazione della biomassa algale dal mezzo liquido. Vantaggio della centrifugazione è l'utilizzo della forza centrifuga per ridurre i tempi necessari, al contrario della sedimentazione, aumentando quindi la produttività e riducendo i costi.

### *Flocculazione*

Flocculazione è un processo in cui le particelle di soluto in una soluzione si uniscono per formare aggregati chiamati fiocchi, favorendo la precipitazione. La flocculazione convenzionale funziona con un meccanismo di dispersione di cariche.

Le microalghe possiedono una carica negativa a seguito di adsorbimento di ioni provenienti dalla matrice organica e alla dissociazione o ionizzazione di gruppi funzionali superficiali. Questa carica negativa superficiale non permette alle microalghe l'autoaggregazione all'interno della sospensione, quindi possono essere raccolte solo utilizzando sostanze chimiche chiamate flocculanti, che fungono da stabilizzanti, e che aiutano a contrastare questa carica negativa presente sulla superficie delle cellule algali. I flocculanti spostano la carica negativa e permettono alle cellule di aggregarsi e quindi essere facilmente separarle dalla soluzione. Viene combinata con metodi di sedimentazione o filtrazione per aumentare l'efficienza della raccolta.

### *Flottazione*

Un'altra metodica utilizzata è la flottazione, che consiste nell'insufflare all'interno della soluzione un gas (in genere aria) all'interno di una vasca agitata (detta "cella di flottazione"), al cui interno sono presenti uno o più componenti solidi in sospensione. Le microalghe presenti nella soluzione, se avranno affinità con il gas, verranno trasportate verso l'alto formando una schiuma, se non avranno affinità con il gas tenderanno a precipitare sul fondo. Un buon metodo per ottimizzare la flottazione è quello di utilizzare un agente flocculante in modo tale da spostare l'equilibrio della biomassa verso la precipitazione.

### **Eliminazione dell'acqua**

L'operazione di concentrazione permette l'eliminazione della maggior parte dell'acqua extracellulare, ma la biomassa contiene ancora una certa quantità d'acqua, che, molto spesso, deve essere eliminata per permettere la buona riuscita dei processi successivi, in particolare quelli legati all'estrazione dei lipidi.

### *Essiccazione*

L'eliminazione dell'acqua intracellulare avviene tramite essiccazione overnight in stufa del campione di microalghe. È il tipo più simile all'evaporazione. La miscela solido-liquido viene scaldata a una temperatura tale da fornire al liquido il calore latente di evaporazione necessario per passare dalla fase liquida a quella gassosa e quindi eliminare l'acqua intracellulare.

### *Liofilizzazione*

Il principio del metodo prevede l'applicazione di calore al campione precedentemente surgelato e mantenuto sottovuoto; l'acqua contenuta all'interno delle cellule è sequestrata sotto forma di

ghiaccio ed estratta direttamente come vapore per sublimazione. Questo poiché si lavora con valori di pressione molto al di sotto di 6,10 mbar, che corrisponde al punto triplo (Pt) dell'acqua, cioè alle condizioni che consentono la contemporanea presenza dell'acqua nelle tre fasi solido-liquido-vapore. Il vapore acqueo estratto deve essere catturato per congelamento su serpentine fredde dette condensatori (con un termine improprio che sembra riferirsi a un passaggio da acqua-vapore ad acqua-liquido, mentre in realtà è da vapore a solido); i gas incondensabili vengono aspirati ed eliminati dalla pompa da vuoto. Il processo viene condotto in condizioni di temperatura e pressione accuratamente controllate per evitare danni alla struttura del campione, così che la matrice originale sia quasi perfettamente ripristinabile quando, al momento dell'utilizzo, si voglia procedere alla reidratazione o alla successiva estrazione.

### **Estrazione di triacilgliceroli (TAG)**

#### *Estrazione con solvente*

I lipidi hanno diversi tipi di interazioni, che devono essere rotte per migliorare l'efficienza di estrazione.

Solventi organici non polari come l'esano spezzano le interazioni idrofobiche tra lipidi non polari; solventi organici polari come gli alcoli spezzano i legami a idrogeno tra lipidi polari. Se sono presenti forti forze ioniche tra i lipidi, basta perturbare il pH spostandolo verso uno stato alcalino. Pertanto la scelta del solvente più adeguato dipende dalla composizione lipidica della microalga scelta. Il solvente ideale deve essere poco costoso, non tossico, estrattore volatile e il più specifico possibile, per evitare l'estrazione di altri componenti cellulari non lipidici.



Una stazione di servizio americana degli anni '40

## RISULTATI E DISCUSSIONE ANALISI CRESCITA CELLULARE, PESO SECCO ED ESTRAZIONE DI OLI

### Sottoprodotti puri

I sottoprodotti puri testati sono stati glucosio, saccarosio, lattosio, acetato di sodio e glicerolo.

Dalle analisi effettuate si può notare come nei campioni cresciuti in zuccheri quali glucosio, saccarosio e lattosio si riscontrano alte concentrazioni (45 g/L), un'inibizione della crescita e un aumento del peso secco, imputabile quindi a un accumulo di TAG all'interno della cellula.

Questa ipotesi è stata poi confermata dalle percentuali di oli estratti, soprattutto per quanto riguarda il lattosio in cui si è arrivati al 22% di olio estratto totale. Per quanto riguarda l'acetato di sodio si nota un calo della crescita a basse concentrazioni (15 g/L) e un aumento con l'aumentare della concentrazione. Il peso secco invece sembra aumentare in tutte e tre le concentrazioni.

L'estrazione di oli in questo caso ha dato il migliore risultato con la crescita in soluzione minore (15 g/L) che nel complesso si è estratto fino al 15% di olio rispetto al peso totale. Questo dato ci viene confermato anche dalla precedente crescita cellulare e peso secco in cui si può notare un calo della crescita e un aumento del peso secco, imputabile all'accumulo di TAG.

L'ultimo sottoprodotto testato, il glicerolo puro è stata la miglior fonte di carbonio metabolizzata dalle microalghe, in cui si è osservato che sia a basse che ad alte concentrazioni (15 e 45 g/L) la crescita sembra non variare molto con un aumento del peso secco.

Infatti andando a estrarre gli oli si è arrivati a due estrazioni con-

Gli altri solventi utilizzati includono benzeni ed eteri, ma è tra tutti l'esano che ha ottenuto più popolarità come solvente chimico adibito all'estrazione di lipidi, sia per la sua efficienza che per la sua economicità, ed è stato quello utilizzato per questa sperimentazione.

### *Estrazione con biossido di carbonio supercritico (SC - CO<sub>2</sub>)*

Si tratta di uno dei nuovi metodi della cosiddetta "Green Technology" che ha il potenziale di spostare l'attenzione dalla tradizionale estrazione con solvente all'utilizzo di CO<sub>2</sub> supercritica per l'estrazione di lipidi.

I motivi della scelta di questo solvente supercritico sono di carattere economico (è poco costosa), ambientale (non è tossica, non danneggia lo strato di ozono, non inquina e non contamina gli estratti) e tecnico (possono essere raggiunte facilmente sia la sua temperatura critica che la pressione critica, rispettivamente pari a 31,1 °C e 73,8 bar).

La CO<sub>2</sub> in fase supercritica assume le caratteristiche di un solvente non polare ed è paragonabile al n-esano; ha la caratteristica di solubilizzare composti che per loro

natura sono scarsamente solubili in acqua (apolari).

Il vantaggio di questa tecnica è che alla fine dell'estrazione, il solvente, il biossido di carbonio, viene allontanato sotto forma di gas, dando la possibilità di recuperare i composti estratti concentrati. Nei processi industriali, la CO<sub>2</sub> può essere riciclata minimizzando il consumo. Lo svantaggio principale è invece reputabile all'alto costo dell'impianto e della tecnologia necessaria.

### *Spremitura a freddo*

Un altro metodo per l'estrazione degli oli da matrici vegetali è la spremitura a freddo. Questa consiste in una prima macinazione tramite mole o macinatori meccanici e in una successiva spremitura a opera di presse idrauliche a pressione.

L'impasto così ottenuto deve poi passare all'interno di un decantatore, che separi la parte solida da quella oleosa. Questa metodica viene già largamente utilizzata per la produzione di oli extravergini di oliva; per quanto riguarda le microalghe può essere utilizzata per evitare l'utilizzo di solventi chimici o metodi troppo dispendiosi.



siderevoli di 19,15% e 16,67% rispettivamente nei due campioni sopraccitati; questo dato ci conferma che il glicerolo è un ottimo candidato per la produzione di TAG.

## Reflui agro-industriali

### Caseari

I reflui testati da industria casearia sono latticello, acqua di filatura e scotta.

Si è osservato nel latticello e nell'acqua di filatura un aumento del peso secco totale. Nel momento in cui però si è compiuta l'estrazione non si sono ottenute grosse rese di olio prodotto dalla microalga.

L'aumento del peso secco in questo caso non è imputabile all'accumulo di TAG, in quanto nel momento in cui veniva effettuata la pesata, oltre alle cellule vi era un residuo solido non ancora caratterizzato che falsava la misura.

Questa rimanenza probabilmente è un residuo della cagliatura del latte.

Per quanto riguarda la scotta, invece, si è osservata un'inibizione della crescita e un aumento del peso secco totale, imputabili alla propensione dell'alga a metabo-

lizzare il lattosio e altre fonti di carbonio organico presenti per immagazzinare TAG, a scapito della crescita cellulare. L'estrazione in questo caso ha dato buoni risultati in tutte e tre le diluizioni andando da 12,02% a 17,32% di olio estratto in proporzione al peso liofilizzato totale.

### Enologici

I reflui da industria enologica testati derivano dal primo lavaggio della feccia, rispettivamente da vino bianco e vino rosso.

Dai risultati ottenuti si è notato un aumento significativo nella crescita sia dalla feccia da vino bianco che dalla feccia da vino rosso. Per il peso secco invece vi è un leggero aumento in entrambi i campioni.

L'estrazione di oli ha portato a un'ottima estrazione nei campioni di feccia da vino rosso, da 11,73% a 22,00% di oli rispetto al peso liofilizzato totale; per quanto riguarda la feccia da vino bianco, un solo campione è stato significativo con un massimo del 8,20% nella diluizione maggiore, sinonimo della presenza di qualche molecola che inibisce l'immagazzinamento dei TAG ad alte concentrazioni.

### Glicerolo

Lo scarto utilizzato dall'industria del biodiesel è il glicerolo crudo offerto da Teregroup/Algamoil. In questo campione si è notato come in tutte e tre le concentrazioni di glicerolo ci sia un aumento sia del numero di cellule che del peso secco totale.

Questo può essere dovuto a una maggior consumabilità della fonte di carbonio da parte della microalga, in quanto essendo il glicerolo una molecola a 3 atomi di carbonio risulta essere più facilmente metabolizzabile.

Per quanto riguarda l'olio estratto si è arrivati a un massimo di quasi 25% alla concentrazione più alta (45 g/L) di glicerolo.

## Gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS)

La caratterizzazione dei TAG è stata fatta utilizzando la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS).

Da questa analisi si nota come la miscela di metil-esteri degli acidi grassi componenti i TAG si mantenga costante in tutte le colture, variando però la concentrazione. Dai cromatogrammi ottenuti si è

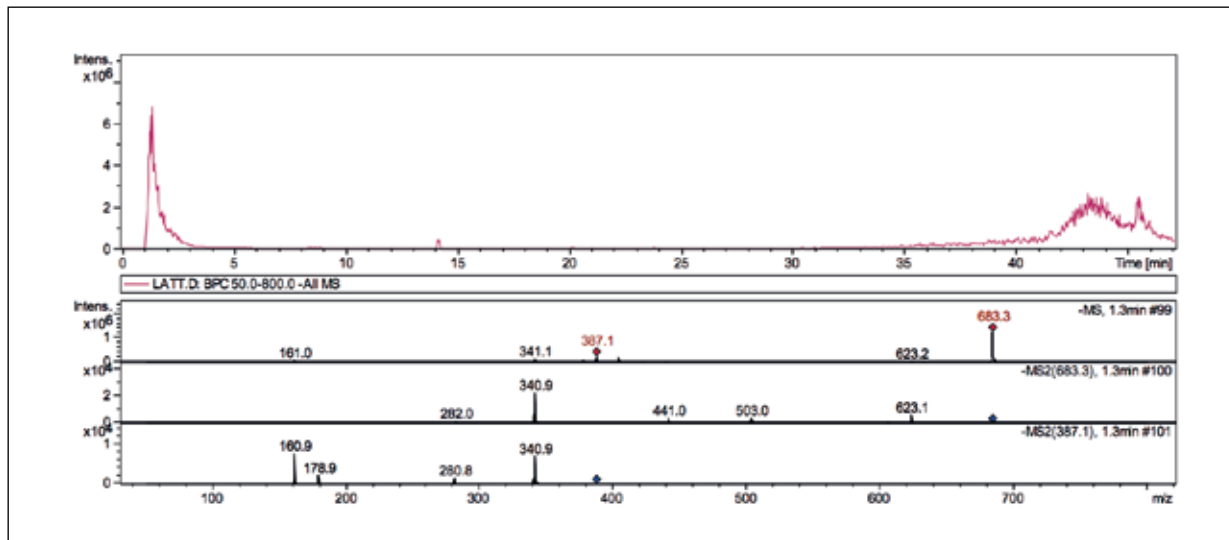


Fig.1. Caratterizzazione con spettrometria di massa del lattosio

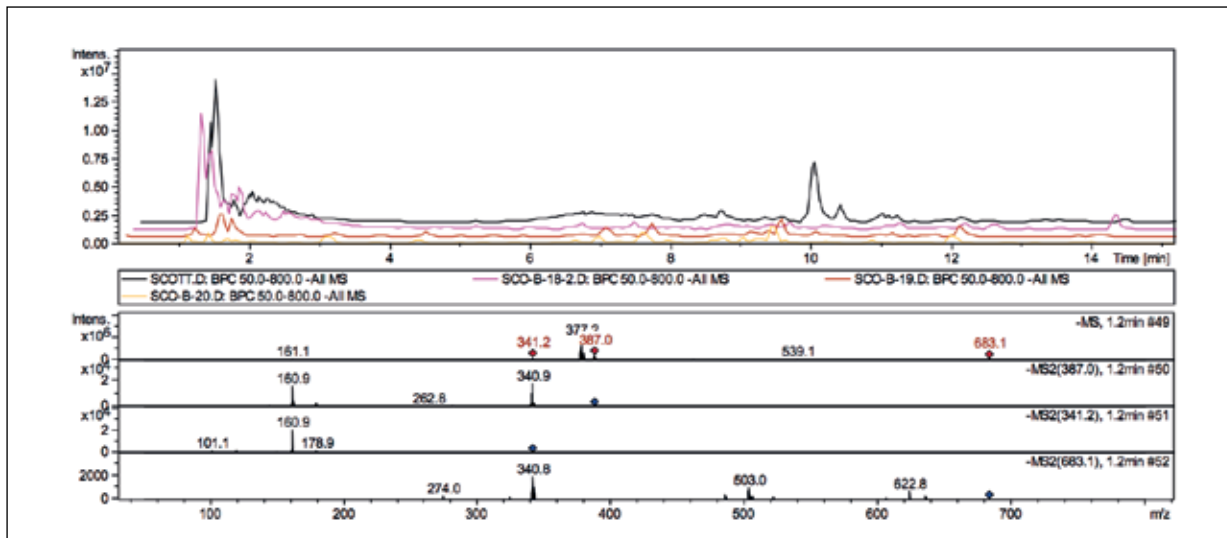


Fig. 2. HPLC-MS degli scarti caseari

notato come ciascun refluo utilizzato dalle microalghe produca TAG con una diversa concentrazione di acidi grassi.

A tal proposito si è osservato che le microalghe cresciute in reflui ricchi di zuccheri mono- e poli- saccaridi come quelli enologici producano TAG con una maggior concentrazione di acido arachidonico (C20:0), mentre microalghe cresciute in reflui caseari e dell'industria del biodiesel utilizzando lattosio e glicerolo come fonte di carbonio tendono a immagazzinare TAG con una maggior concentrazione in acido stearico (C:18:0).

### HPLC-MS

Per la valutazione della variazione della concentrazione della fonte di carbonio utilizzata dalle microalghe si è deciso di utilizzare un HPLC accoppiato alla spettrometria di massa.

Nelle figure 1 e 2 si può notare come nei reflui dell'industria casearia vi sia un picco attorno a 3 minuti, che diminuisce di intensità gradualmente nei giorni successivi fino quasi a scomparire nell'ultimo giorno, sinonimo che la microalga ha metabolizzato il composto corrispondente. Questo picco è stato caratterizzato mediante spettrometria di massa,

che ha confermato si tratta di lattosio.

Per quanto riguarda i cromatogrammi dei reflui enologici (figure 3 e 4) si possono notare diversi picchi i quali, mano a mano che passano i giorni, vengono consumati dalle microalghe; purtroppo la caratterizzazione di queste molecole è ancora al vaglio in quanto le miscele che derivano dalle industrie enologiche sono molto complesse.

Possiamo però notare i primi picchi attorno al minuto 2 che se vengono comparati con i picchi del saccarosio e di altri poli- e mono-saccaridi risultano essere

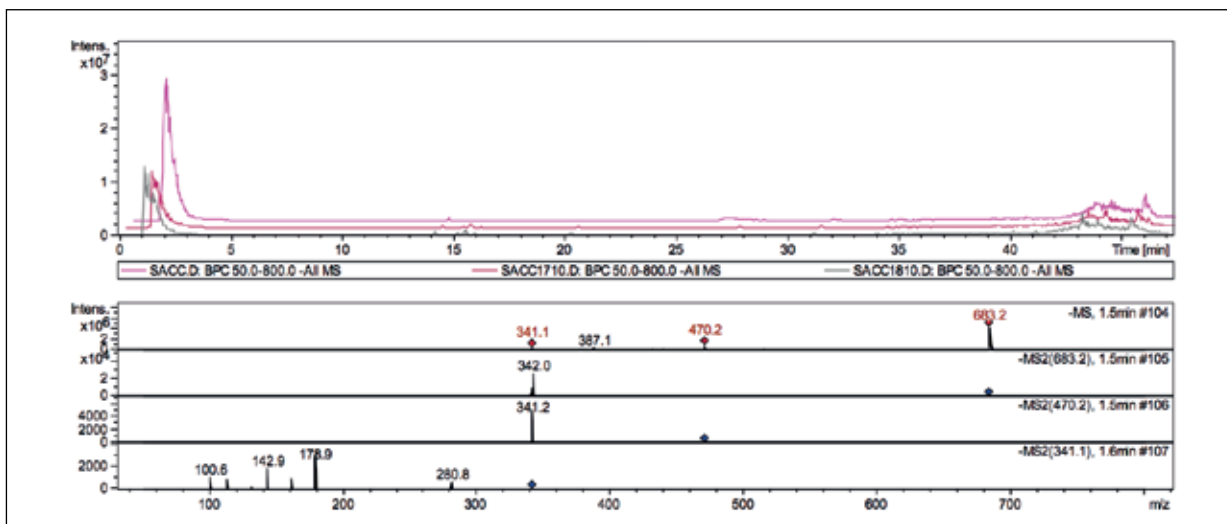


Fig. 3. Caratterizzazione con spettrometria di massa del saccarosio

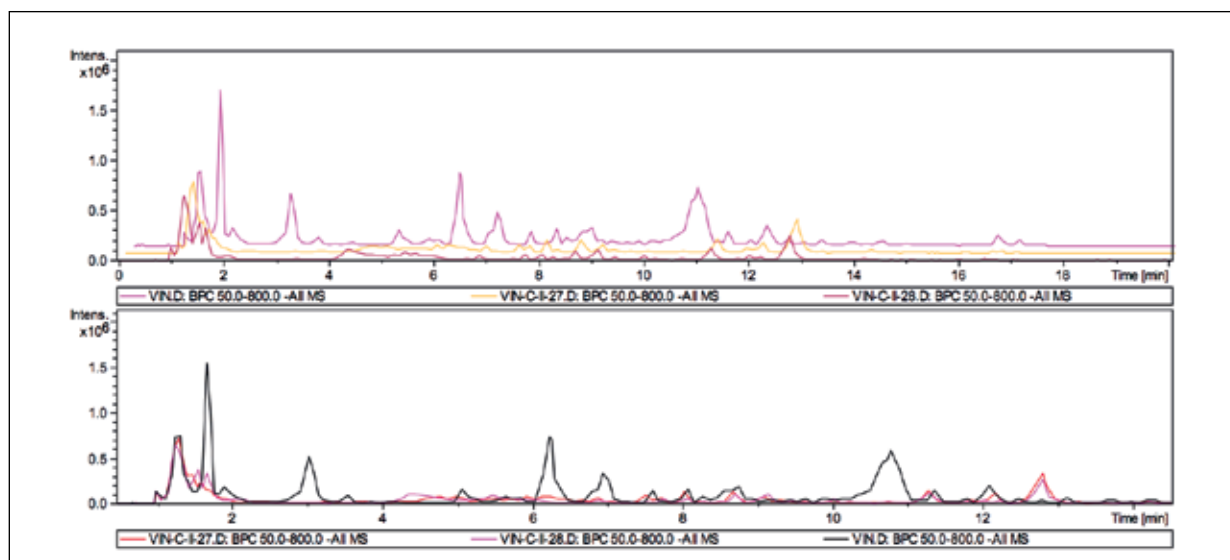


Fig.4. HPLC-MS dei reflui enologici

quasi sovrapponibili; questo ci dice che in quel range di tempo vi è una miscela di zuccheri utilizzati dalla microalghe.

A favore di questa ipotesi si può notare la frammentazione del saccarosio.

## Conclusione

Dai risultati ottenuti in questo lavoro si può dedurre che tre reflui risultano idonei a essere metabolizzati dalle microalghe per la produzione di TAG, rispettivamente scotta, feccia rossa e glicerolo crudo: impiegando questi reflui come fonti di carbonio, le microalghe sono in grado di produrre fino al 25% del loro peso secco in olio. All'interno di questi reflui le microalghe hanno ritrovato molecole più facilmente metabolizzabili per la produzione di TAG, inibendo la crescita cellulare.

Gli altri reflui invece risultano essere idonei a essere utilizzati per la produzione di biomassa algale, in quanto si nota un netto aumento del numero di cellule e del peso secco globale. Le microalghe, in questi reflui, ritrovano molecole più facilmente metabolizzabili per la crescita piuttosto che per l'immagazzinamento di TAG.

I risultati sono incoraggianti e fanno pensare che in seguito a un lavoro di ottimizzazione delle condizioni di crescita si possa ottenere un aumento della quantità di olio prodotta.

**\* Il presente articolo rielabora la tesi di laurea magistrale in Biotecnologie Industriali svolta dall'Autore presso il Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, relazione prof. Luca Forti, correlatore dott.ssa Mariaelena Beraldi.**

## Bibliografia

- Cheng Y, Lu Y, Gao C, Wu Q. Algae-based biodiesel production and optimization using sugarcane as the feedstock. *Energy Fuels* 2009; 23: 4166–73.
- Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats ethanol. *Trends Biotechnol* 2008; 26:126–31. *Biotechnol Adv* 2007; 25:294–306.
- Hossain ABMS, Salleh A, Boyce AN, Chowdhury P, Naquiddin M. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2008;4:250–4.
- Huang GH, Chen F, Wei D, et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl Energy* 2010; 87:38–46.
- Li Q, Du W, Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 80:749–56.
- Li X, Xu H, Wu Q. Large-scale biodiesel

production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 2007;98:764–71.

- Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Biore-source Technology* 2006; 97:841–6.
- Miao X, Wu Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology* 2004; 110: 85–93.
- Miao XL, Wu QY. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Biore Technol* 2006;97(6):841e6.
- Michael A. Borowitzka, Navid R. Moheimani. *Algae for Biofuels and Energy*, Murdoch, WA, Australia, Springer, 2013
- Shen Y, Yuan W, Pei Z, Mao E. Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010; 160:1674–84.
- Vasudevan PT, Briggs M. Biodiesel production-current state of the art and challenges. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008; 35(5):421e30.
- Xiong W, Li XF, Xiang JY, Wu QY. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 78:29–36.
- Xu H, Miao X, Wu Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology* 2006; 126:499–507.