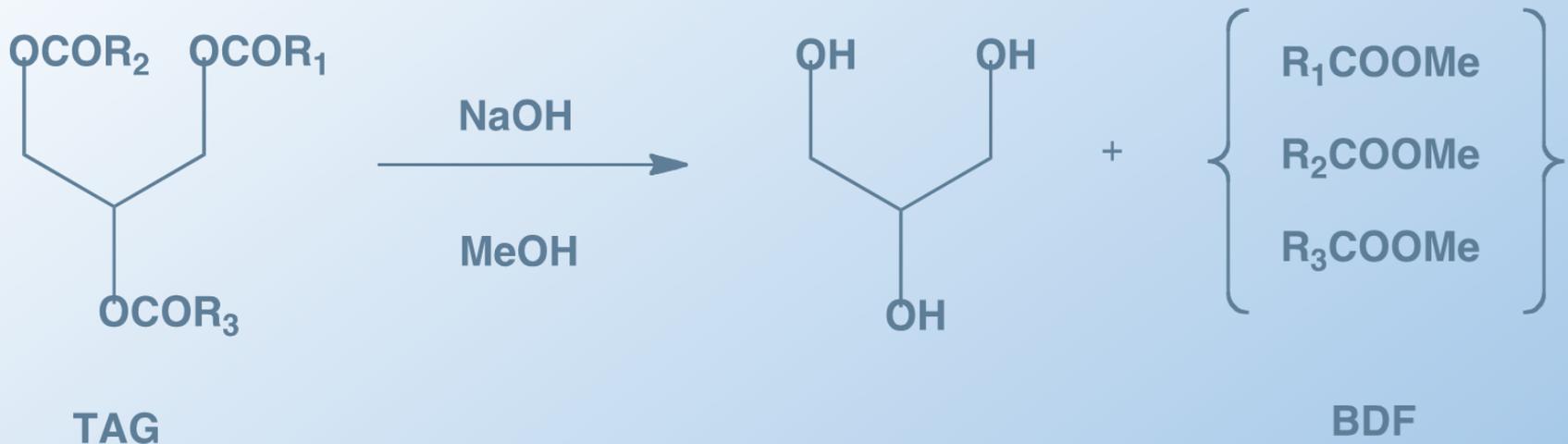


BIODIESEL
CON
ENZIMI

BIODIESEL CON ENZIMI

Il biodiesel (BDF) è definito come esteri degli acidi grassi (FA) prodotto da oli vegetali (triacilgliceroli TAGs) e alcoli a corta catena e di solito si riferisce a esteri di FAs con metanolo che è l'alcol più economico.

BDF è prodotto oggi con un processo chimico che prevede un catalizzatore basico



Nel processo chimico....

Gli oli usati, tuttavia, contengono piccole quantità di acqua e acidi grassi liberi (FFA) oltre a composti ossidati, come aldeidi, epossidi e polimeri.



svantaggi:

- **l'alto costo energetico del processo**
- **l'interferenza degli acidi grassi liberi (FFAs) e l'acqua**
- **la necessità di rimuovere il catalizzatore alcalino dal prodotto**
- **la difficoltà di recuperare il glicerolo**
- **il trattamento delle acque alcaline di rifiuto**

Per superare questi problemi è del 2007 la proposta di utilizzare:

- **resine a scambio ionico,**
- **metanolo supercritico o vapore**
- **lipasi immobilizzate**

IL PROCESSO ENZIMATICO, un po' di storia

Le lipasi catalizzano non solo l'idrolisi, ma anche l'esterificazione e la transesterificazione.

La metanolisi dei TAGs con lipasi è considerato uno dei metodi più efficienti per la produzione di BDF da residui alimentari e da oli eccedenti.

**La prima conversione di TAGs in FAMEs con lipasi
viene riportata nel 1990**



Si sono utilizzati oli vegetali raffinati come materiali di partenza.

Per l'industria è importante produrre BDF partendo:

- da residui di oli alimentari
- da grassi da ristorazione
- da oli acidi derivanti dalla produzione di saponi

è necessario un processo in continuo con lipasi immobilizzata a causa degli alti costi dell'enzima

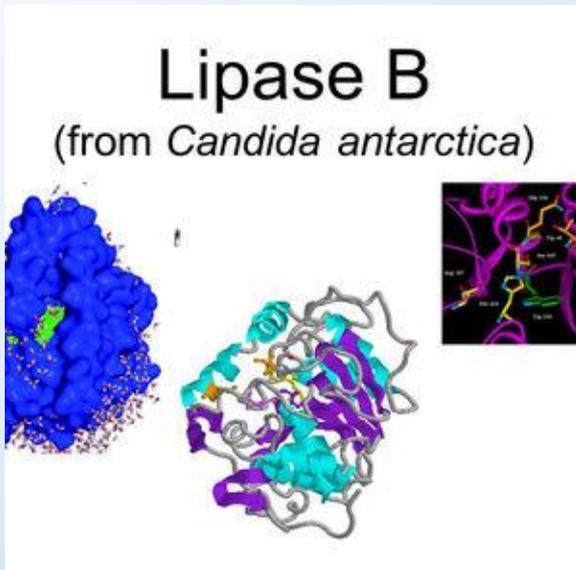
è necessario un sistema libero da solventi organici per evitare problemi di tossicità e di infiammabilità.

Le lipasi (triglicerol acil-idrolasi) sono classificate come idrolasi e agiscono sopra legami esteri presenti negli acilgliceroli, liberando acidi grassi e glicerolo, costituendo una classe speciale di esterasi.

LE LIPASI

Le lipasi sono situate in vari tessuti di animali e piante, e possono essere prodotte per fermentazione usando varie specie di microrganismi, quali i funghi di *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, per i lieviti di *Tulopsis* sp e *Candida* sp e batteri come *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp.

Il sito catalitico è formato per la triade catalitica Ser-His-Asp/Glu, che si ripete in tutte le strutture ed è sempre protetto da una molecola che funge da “tappo” idrofobico o “lid” che quando interagisce con l’interfaccia lipide/acqua subisce una modifica conformazionale, esponendo il sito attivo.



Sono state provate lipasi immobilizzate da:

***Rhizomucor miehei*,**
***Candida antarctica*,**
Burkholderia cepacia

ma solo lipasi da ***Candida antarctica*** ha mostrato caratteristiche di lunga durata.

ENZIMI IMMOBILIZZATI

Il principale interesse nell'immobilizzare un'enzima e' ottenere un biocatalizzatore con attivita' e stabilita' che non siano mutabili durante il processo.

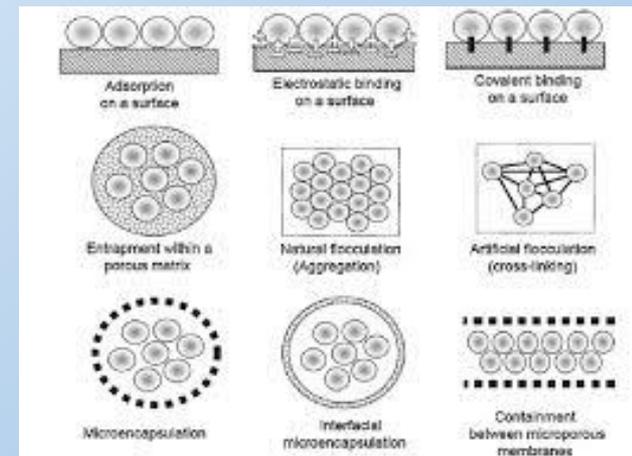
Tuttavia....

l'immobilizzazione puo' inibire o aumentare l'attivita' e la stabilita' dell'enzima, pero' non esiste una regola che predica la manutenzione di questi parametri dopo il processo di immobilizzazione.

Lo sviluppo di tecniche di immobilizzazione e' stato importante per il riutilizzo dell'enzima, facilitare la separazione dei prodotti e aumentare la stabilita' in solventi organici.

Tecniche di immobilizzazione:

- ✓ l'adsorbimento,
- ✓ legame dell'enzima in un materiale insolubile,
- ✓ uso di un reagente multifunzionale con legame crociato,
- ✓ confinamento in matrici formate per gel polimerici,
- ✓ incapsulazione mediante membrana polimerica.



Transesterificazione con lipasi da *Candida antarctica*

La transesterificazione enzimatica viene solitamente eseguita a temperature inferiori rispetto alla transesterificazione chimica per evitare la perdita di attività della lipasi. La temperatura ottimale determinata per varie lipasi varia da 30 a 55 ° C, cercando un compromesso tra la stabilità operativa della lipasi e la velocità di reazione della transesterificazione

Possono essere utilizzati vari tipi di accettori acilici come alcoli (primari, secondari, lineari e ramificati) o esteri.

A causa del suo prezzo e della sua disponibilità, il metanolo è stato ampiamente utilizzato per la produzione enzimatica di biodiesel, ma le lipasi subiscono una grave inibizione che ne riduce le prestazioni L'aggiunta progressiva di metanolo è la strategia più comune per prevenire l'inattivazione della lipasi.

Anche l'utilizzo di diversi accettori di acile come l'acetato di metile, può anche prevenire la disattivazione della lipasi

Le lipasi catalizzano in modo efficiente la transesterificazione quando i substrati si sciolgono l'uno nell'altro.

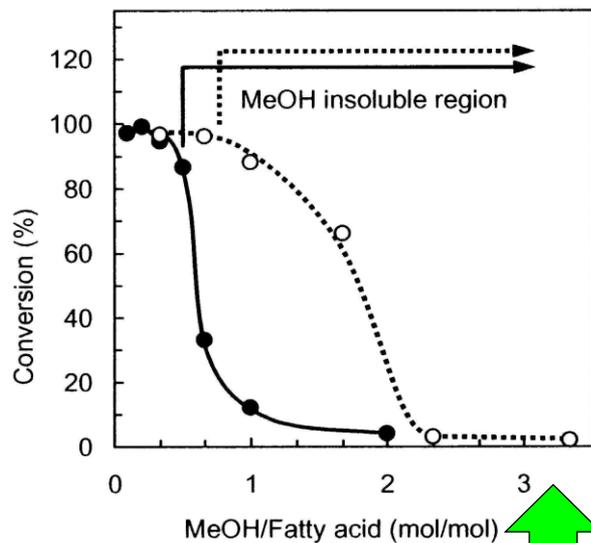
| | | |
|---|--------------|------------------|
| Alcoli con 3 o più atomi di carbonio | 1 : 1 | in olio vegetale |
| MeOH | 1 : 2 | in olio vegetale |
| EtOH | 2 : 3 | in olio vegetale |

A dispetto di questo tutte le reazioni di alcolisi di TAGs vengono fatte con quantità di MeOH (EtOH) più alte del rapporto stechiometrico.

Si sa che le proteine sono generalmente instabili alla presenza di alcoli a corta catena e quindi la bassa metanolisi (etanolisi) è imputabile all'inattivazione della lipasi al contatto con l'alcol insolubile che si organizza in micelle all'interno dell'olio

Oggi il metanolo è completamente consumato nella metanolisi degli oli vegetali con un rapporto stechiometrico 1 : 3 e la transesterificazione peggiora se si raggiunge un rapporto 1 : 2.

Inattivazione irreversibile di lipasi da *Candida antarctica* in presenze di micelle di metanolo

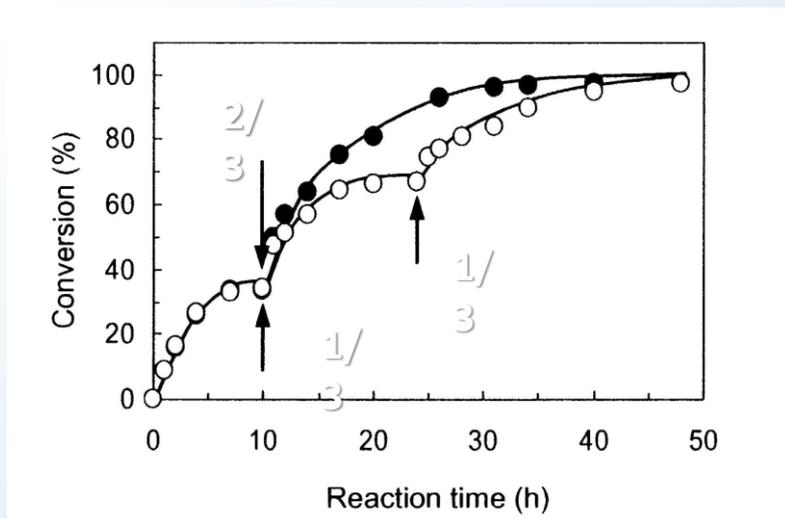


- Olio vegetale e MeOH
- TAGs con 33% di FAMEs e MeOH

l'inattivazione della lipasi, una volta avvenuta, è irreversibile

Poiché comunque la completa metanolisi richiede una quantità equimolare di metanolo, vengono aggiunte successivamente 1/3 di equivalenti di metanolo.

Metanolisi di oli vegetali a step



- Reazione a due stadi
- Reazione a tre stadi

Il primo stadio viene condotto con TAGs e 1/3 di metanolo con lipasi da *C. antarctica* immobilizzata. La conversione arriva al 33% in 7 h e il metanolo viene consumato completamente.

Con la seconda aggiunta a 10 h di 1/3 di metanolo la conversione raggiunge il 66% in 24 h.

Alla fine viene aggiunta la terza aliquota e dopo 48 h la conversione è del 98%.

Mentre la solubilità di metanolo in TAGs è bassa, è alta in FAMEs.

**Dopo il primo stadio di reazione la composizione della miscela è
67% TAGs e 33% FAMEs.**

**La solubilità di MeOH in FAMEs è 2/3 e quindi la lipasi non viene inattivata
se nel secondo stadio viene utilizzata una miscela TAGs/FAMEs
a 2/3 di metanolo e quindi gli stadi si possono ridurre a due
con una conversione del 96 % in 36 h.**

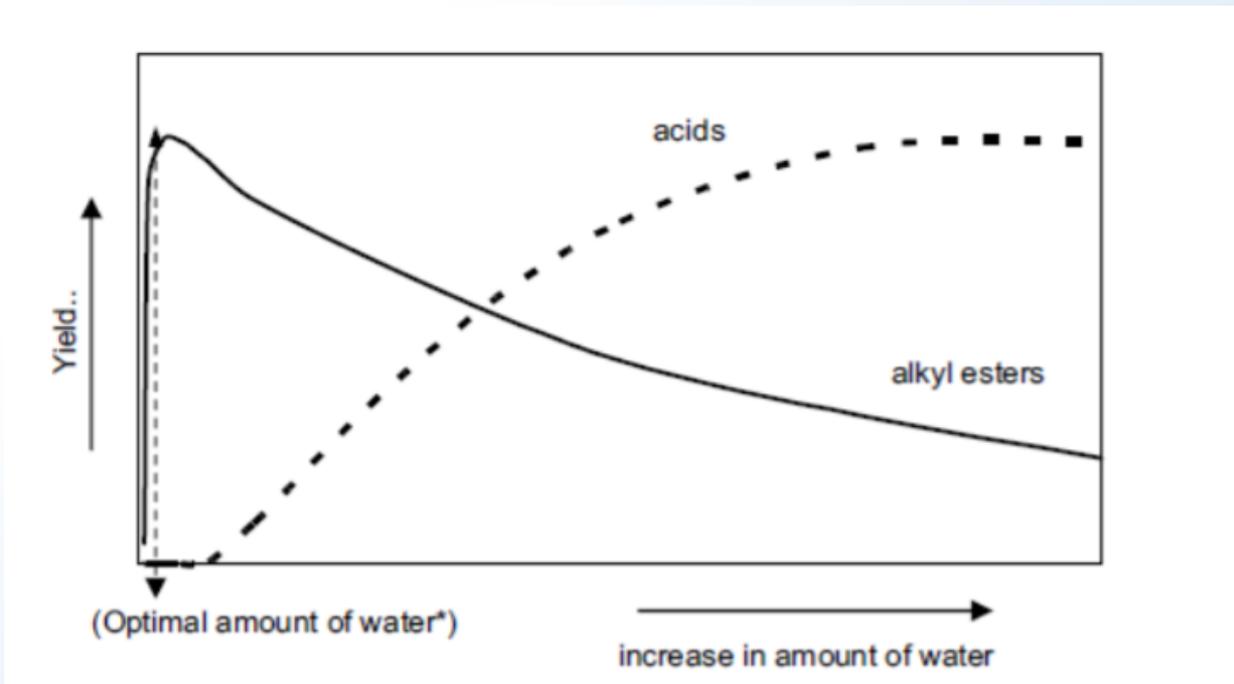
**Queste due metodologie sono state usate e confrontate sulla stabilità della
lipasi.**

**In entrambi i casi la lipasi è stabile per oltre 100 giorni senza perdita
significativa di attività.**

Le lipasi e l'acqua

Il contenuto di acqua nelle miscele di reazione può essere espresso come attività dell'acqua (a_w) o concentrazione percentuale (%). La concentrazione dell'acqua nella miscela di reazione viene solitamente misurata con il metodo Karl-Fischer (espresso come contenuto percentuale) ed è uno dei fattori più importanti che influenzano la velocità di transesterificazione catalizzata dalla lipasi e la resa della sintesi del biodiesel.

Numerosi studi hanno rivelato che l'aggiunta di una piccola quantità di acqua alla miscela di reazione catalizzata da enzimi aumentava la velocità di sintesi degli esteri degli acidi grassi.



La protezione dell'acqua che circonda le lipasi è importante per una conformazione ottimale dell'enzima.

All'aumentare del contenuto di acqua, l'idrolisi inizia a competere con la transesterificazione e l'equilibrio si sposta verso l'idrolisi.

L'attività ottimale dell'acqua per il sistema di reazione di transesterificazione enzimatica è specifica per ogni data lipasi.

BDF DA OLI VEGETALI ALIMENTARI DI SCARTO

Oli vegetali freschi e i loro rifiuti differiscono in maniera sostanziale nel contenuto di acqua e di FFAs.

Solo lo 0.1% di acqua diminuisce la velocità di metanolisi dei TAGs con lipasi immobilizzata ma non cambia l'equilibrio della reazione.

Un olio alimentare di rifiuto contenente in media lo 0.2% di acqua e il 2.5% di FFAs subisce metanolisi con 1/3 di metanolo su FAs totali.

Quando la reazione viene fatta con lo stesso enzima piano piano la velocità di reazione aumenta e raggiunge un valore costante dopo un certo numero di cicli, sebbene la conversione sia il 33% fino dal primo ciclo.

Questo aumento di velocità si può spiegare considerando che l'acqua nell'olio è attratta dalla fase glicerica generata dalla metanolisi. In questo modo l'acqua si allontana dalla fase oleosa dove avviene la metanolisi e la velocità aumenta

In questo modo un olio alimentare di rifiuto usato senza alcun trattamento iniziale viene convertito in FAMES in tre stadi e la conversione è del 93% dopo 48 h

(Watanabe 2001, J.Am.Oil Chem. Soc., 78, 703)

rispetto al 98% degli oli vegetali raffinati

(Shimada 1999, J.Am. Oil Chem. Soc., 76, 789).

Le rese più basse sono dovute al fatto che quando un olio vegetale viene usato per friggere alcuni FAs vengono convertiti in epossidi, aldeidi e polimeri per ossidazione e per polimerizzazione termica.

Poiché la lipasi non riconosce questi prodotti ossidati le rese diminuiscono rispetto agli oli raffinati.

Inoltre il contenuto di FFAs dopo la reazione (0.3 %) è più basso che negli oli di scarto (2.5 %) questo indica che l'esterificazione dei FFAs avviene insieme alla metanolisi degli oli.

I contaminanti degli oli di scarto non interferiscono con il processo e nemmeno con la stabilità della lipasi.

I FFAs nel processo chimico si trasformano in saponi e l'acqua crea disturbo e quindi entrambi questi prodotti dovrebbero essere eliminati prima della reazione e le piccole quantità di sapone devono essere rimosse alla fine del processo lavando con acqua.

Il processo enzimatico non richiede trattamento preparatorio né processi downstream

BDF DA FFAS DI SCARTO

I processi industriali per la produzione di oli e grassi e materiali a essi correlati danno



FFAs di scarto



produzione di pitture,
lubrificanti e saponi



FAMES



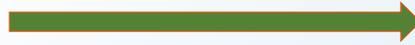
Sovraproduzione
Crollo prezzi



1. Processo chimico

FFAs

Catalizzatore acido



FAMEs

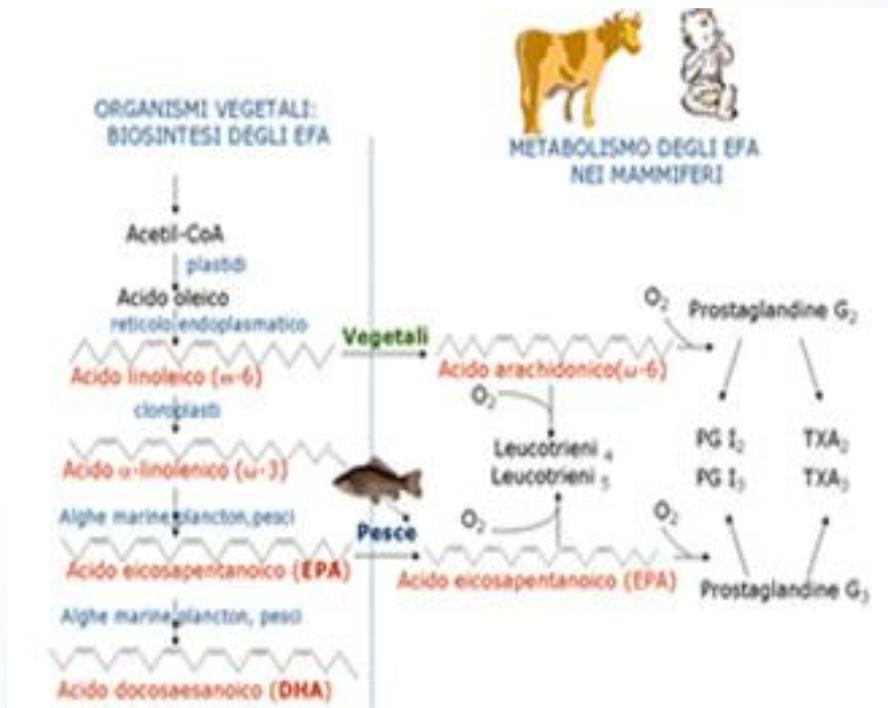


rimozione del catalizzatore e
il trattamento dei residui acidi

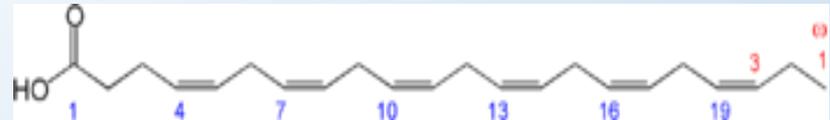
2. Processo enzimatico: viene effettuato con *C. antarctica* immobilizzata

Si inserisce nella grande richiesta del mercato di acido docoesenoico (DHA)





Influenza positiva nella crescita dei bambini nati prima del termine



DHA

L'acido docoesenoico (DHA) è un acido grasso omega-3.

E' un acido carbossilico con 22 atomi di carbonio e sei doppi legami.

Il primo doppio legame è situato sul terzo carbonio dalla fine della catena.

Il suo nome comune è acido cervonico ed il suo nome IUPAC è acido *cis*-docosa-4,7,10,13,16,19-esenoico.

Gli oli di pesce sono ricchi di DHA. DHA è il principale acido grasso dei fosfolipidi dello sperma e del cervello, in particolare della retina.

L'uso di DHA nella dieta riduce il rischio di infarto diminuendo i trigliceridi nel sangue. Bassi livelli di DHA sono associati con la malattia di Alzheimer

Oli ricchi di DHA sono prodotti industrialmente per idrolisi selettiva dell'olio di tonno con lipasi da *C. rugosa* che agisce debolmente sul legame estereo di DHA.

Poiché più del 70% dell'olio di tonno da come sottoprodotto i FFAs dall'idrolisi, è stata studiata la conversione di questi FFAs a FAMES.

L'esterificazione dei FFAs da olio di tonno avviene con metanolo da 1 a 10 molare con *C. antarctica* immobilizzata.

La velocità di reazione diminuisce all'aumentare del metanolo.

Il grado di esterificazione a 24 h (vicino all'equilibrio) è 88% con 1 mole metanolo per mole di FFAs e 95% con 2 moli.

Con un rapporto maggiore la conversione non aumenta perché si raggiunge l'equilibrio tra l'esterificazione e l'idrolisi.

Si possono migliorare le rese strippando l'acqua che si forma.

BDF DA OLI ACIDI MODELLO

Gli oli vegetali sono raffinati attraverso processi:

- di estrazione sotto pressione,
- di eliminazione di resine,
- di deacidificazione con basi,
- di decolorazione e deodorizzazione

La deacidificazione produce saponi come sottoprodotti.

L'acidificazione di questi sottoprodotti fornisce quelli che vengono detti



oli acidi che contengono FFAs, TAGs e altri composti lipofilici

Il processo chimico richiede grandi quantità di metanolo e un catalizzatore acido per avere rese alte di esteri.

Per evitare questo i TAGs vengono completamente idrolizzati a FFAs prima di essere esterificati a FAME.

E' ovvio che bisogna eliminare da BDF l'acido e trattare i residui acidi di lavorazione.

Per evitare questi problemi è stato studiato il processo enzimatico.

Anche in questo caso si utilizza lipasi da *Candida antarctica*.

Una miscela di uguale peso di oli vegetali (TAGs) e FFAs viene trattata con una quantità di MeOH equimolecolare ai FFAs totali presenti nella miscela in presenza di lipasi immobilizzata.

Al contrario delle aspettative solo i FFAs vengono esterificati a FAMES e la maggior parte dei TAGs risulta non reattiva anche se si utilizzano eccessi di metanolo.

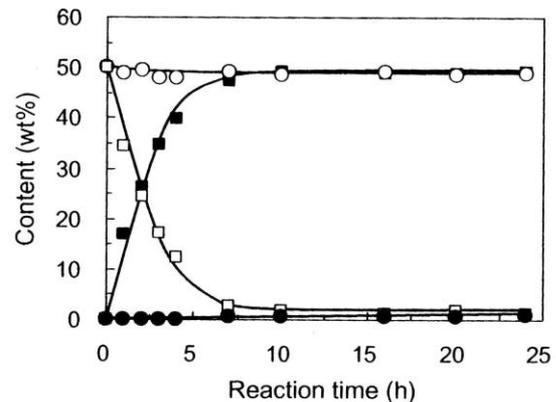


Figure 2.3. Time course of treatment of acid oil model using immobilized *C. antarctica* lipase. A mixture of equal weights of vegetable oil and FFAs was allowed to react at 30°C with an equimolar amount of MeOH to total FFAs in the reaction system using 0.5 wt% immobilized lipase. ○, Content of TAGs; ●, DAGs; □, FFAs; ■, FAMES.

Il problema è l'acqua che si forma nell'esterificazione dei FFAs.

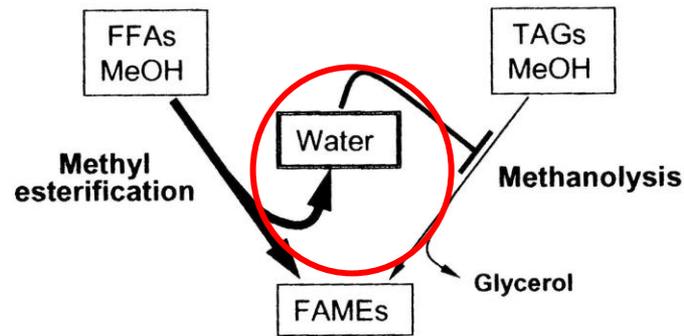


Figure 2.4. Reactions in a mixture of FFAs, TAGs, and MeOH with immobilized *C. antarctica* lipase.

La metanolisi dei TAGs con lipasi diminuisce con lo 0.05% in peso e si ferma con appena il 3% in peso di acqua.

La metil esterificazione dei FFAs raggiunge il 95% in 3 h con l'1% di lipasi immobilizzata, mentre il 95% di metanolisi dei TAGs richiede 30 h con il 4% di lipasi immobilizzata.

Questi risultati indicano che l'esterificazione è 40 volte più veloce della metanolisi.

Nella reazione della miscela FFAs/TAGs/MeOH con lipasi immobilizzata l'esterificazione procede più velocemente producendo acqua che inibisce la metanolisi dei TAGs che rimangono inalterati.



IMPIANTO A DUE STADI

- 1. Il primo stadio è l'esterificazione dei FFAs della miscela: il prodotto di questa reazione sono FAMEs e TAGs e acqua che viene rimossa per evaporazione.**
- 2. Il secondo è la metanolisi dei TAGs in miscela con i FAMEs**

Il primo stadio della reazione viene condotto sulla miscela FFAs/TAGs 1:1 con MeOH equimolare ai FAs (2 moli per FFAs) usando lipasi 0.5% in peso



Dopo reazione la quantità di FFAs scende allo 1.3%

La frazione oleosa e l'enzima immobilizzato vengono separati e MeOH e acqua presenti nell'olio vengono rimossi a pressione ridotta.



All'olio risultante viene aggiunta una quantità di MeOH equimolare ai FAs (FFAs e acilgliceroli) e 6% di lipasi e si procede con il secondo stadio.

Il primo ed il secondo stadio vengono ripetuti ogni 24 h trasferendo l'enzima a substrato fresco.

Le rese si mantengono al 96% per 100 giorni.

BDF da oli acidi di scarto dalla raffinazione di oli vegetali

Il processo precedente si può utilizzare anche per i residui di raffinazione degli oli vegetali.

In questi casi la composizione della matrice è la seguente:

78% di FFAs,

8% di TAGs,

3% di DAGs,

1% di fitosteroli,

2% di FA esteri steroidici (FAStEs) e

8% di composti lipofilici sconosciuti.

Il primo stadio al solito è l'esterificazione dei FFAs condotta con una quantità di MeOH equimolare ai FFAs totali usando lipasi immobilizzata.

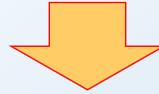
**Il grado di esterificazione raggiunge il 91% (contenuto in FAMEs 78%)
dopo 24 h**

**la ripetizione della reazione diminuisce drasticamente
l'attività della lipasi (50% in 3 giorni).**

L'inattivazione della lipasi può essere spiegata come segue:

- la lipasi immobilizzata si inattiva in presenza di grandi quantità di metanolo
- gli oli acidi contengono sostanze sconosciute o composti che inattivano la lipasi
- aggiunte di grandi quantità di MeOH abbassano l'inattivazione riducendo l'interazione tra lipasi e sostanze sconosciute
- l'inattivazione della lipasi in presenza di più di 8 moli di MeOH è dovuta al MeOH stesso

**Sulla base di queste considerazioni,
il primo stadio viene condotto con 5 moli di MeOH per FAs totali
negli oli acidi usando 1% di lipasi immobilizzata.**



**Il grado di esterificazione dei FFAs sale al 96% (contenuto di FAME 77%),
inoltre quando la reazione viene ripetuta trasferendo la lipasi
su substrato fresco ogni 24 h,
il grado di esterificazione dopo 60 cicli è 94% (contenuto di FAME 77%)
e dopo 100 cicli 88% (contenuto di FAME 71%).**

**Dopo il primo stadio, la lipasi immobilizzata viene rimossa e l'olio recuperato viene
purificato dall'acqua e dal MeOH per evaporazione.**

La composizione di questa frazione è:

80% di FAMEs,

2% di FFAs,

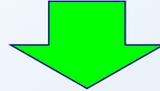
10% di TAGs,

1% di steroli,

2% di FAStEs e

5% di composti sconosciuti.

Il secondo stadio è la metanolisi degli acilgliceroli.



Una miscela dell'olio disidratato e 5 moli di MeOH per FAs (FAs in acilgliceroli e FFAs) viene fatto reagire su lipasi.

Dopo 24 h il contenuto di FAMEs cresce dall'80% al 91% e il contenuto di acilgliceroli passa dal 10 allo 0.9% e dei FFAs passa dal 2 allo 0.8%.

Ripetere la reazione fa diminuire l'attività della lipasi del 50% in 5 giorni.

L'aggiunta di MeOH che fa aumentare la stabilità del catalizzatore nel primo stadio non ha nessun effetto in questo stadio.

Questa instabilità viene evitata aggiungendo olio vegetale alla miscela fino a raggiungere una concentrazione di TAGs del 50% e con una quantità di MeOH equimolare ai FAs non reagiti.

I TAGs vengono convertiti in FAMES e questi raggiungono il 91% dopo 24 h. Comunque quando la reazione viene ripetuta ogni 24 h con la stessa lipasi, l'attività decresce rapidamente dopo 30 cicli.

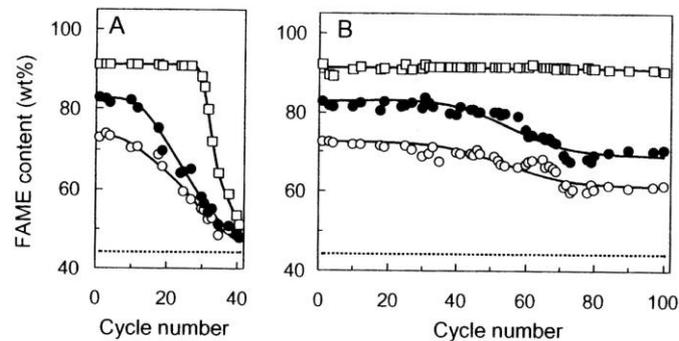


Figure 2.5. Stabilization of immobilized *C. antarctica* lipase in the second-step reaction by addition of vegetable oil and glycerol. The reaction was repeated at 30°C with 6 wt% immobilized lipase by transferring the lipase to a fresh substrate mixture every 24 h. **A**, A reaction mixture was composed of dehydrated first-step product, rapeseed oil, and MeOH. Rapeseed oil was added to give the acylglycerol content of 50%, and the amount of MeOH was an equimolar amount to unreacted FAs. **B**, A reaction mixture was prepared by adding 10 wt% glycerol to the mixture used in Figure A. ○, The content of FAMES at 2 h; ●, at 4 h; □, at 24 h. Dotted lines indicate the content of FAMES before the reaction (44.1 wt%).

L'inattivazione della lipasi dopo 30 cicli viene eliminata e il contenuto di FAMES raggiunge il 90% anche dopo 100 cicli.

La composizione dell'olio del secondo stadio dopo 60 cicli è la seguente:

91% di FAMES,

0.6% di FFAs,

0.8% di TAGs,

2 % di DAGs,

0.6% di steroli,

1% di FAStEs, e

3% di composti oleosi sconosciuti

Riassumendo...

**Produzione BDF con catalisi
basica/acida**

VS

**Produzione BDF con catalisi
enzimatica**

Le lipasi



situate in vari tessuti di animali e piante

possono essere prodotte per fermentazione

Il sito catalitico è formato per la triade catalitica Ser-His-Asp



Immobilizzazione:

- riutilizzo dell'enzima,
- facilita la separazione dei prodotti,
- aumentare la stabilità in solventi organici.

- Inattivazione irreversibile di lipasi in presenza di micelle di metanolo (transesterificazione in 3/2 step)
- La presenza di acqua deve essere bilanciata (troppa: reazione sbilanciata verso l'idrolisi, poca: meno flessibilità del sito catalitico).

Materie prime

BDF DA FFAS DI SCARTO

Un olio alimentare di rifiuto contenente in media lo 0.2% di acqua e il 2.5% di FFAs subisce metanolisi con 1/3 di metanolo su FAs totali.

BDF DA OLI VEGETALI ALIMENTARI DI SCARTO

Esempio: esterificazione FFAs da olio di tonno
Il grado di esterificazione a 24 h (vicino all'equilibrio) è 88% con 1 mole metanolo per mole di FFAs e 95% con 2 moli.

BDF DA OLI ACIDI

IMPIANTO A DUE STADI

esterificazione dei FFAs della miscela: il prodotto di questa reazione sono FAMES e TAGs e acqua che viene rimossa per evaporazione.

metanolisi dei TAGs in miscela con i FAMES

Fine