



**Borsa di studio attivata ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021**

Titolo del progetto: Nuovi approcci biotecnologici per la produzione di biodiesel

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo:  
PROCESSI CHIMICI PER L'INDUSTRIA E PER L'AMBIENTE

Responsabile scientifico: Cleofe Palocci

Area per la quale si presenta la richiesta: GREEN

Numero di mensilità da svolgere in azienda: 12

Azienda: ECOFOX S.p.A.

Progetto di ricerca:

La società moderna sta attualmente affrontando una delle peggiori crisi energetiche della storia. Molti paesi su scala mondiale sono ancora fortemente dipendenti dal petrolio per quanto riguarda la produzione di energia e di carburanti per il trasporto, mentre il prezzo del barile sta salendo costantemente e raggiungendo in breve tempo dei valori record.

Così, l'unica possibile soluzione alla crisi è trovare nuove fonti ecosostenibili (rinnovabili) ed economicamente vantaggiose per la produzione di energia alternativa; ci sono molte possibilità che soddisfano il criterio di sostenibilità, per esempio il solare, l'eolico, il geotermico e le biomasse.

Tuttavia, le fonti che soddisfano anche il criterio economico, sono poche. La migliore soluzione, che soddisfa entrambe i criteri, sembra essere il biodiesel.

La produzione di biodiesel per transesterificazione reazione tra un trigliceride e un alcol che porta alla formazione di una miscela di acidi grassi e glicerina. Per spostare la reazione verso il massimo rendimento possibile e quindi avere solamente la formazione di trigliceridi quali prodotto di reazione si può lavorare in condizioni di eccesso di alcol nel mezzo di reazione. L'impiego di un catalizzatore acido o base è come noto un processo industrialmente consolidato per la sua alta conversione e velocità di reazione. In particolare la reazione di transesterificazione normalmente viene realizzata utilizzando catalizzatori basici, poiché permettono di ottenere una velocità di reazione molto più elevata rispetto a quello acidi, mantenendo l'ambiente di reazione a 50-60°C. I catalizzatori basici inorganici che possono essere utilizzati per la produzione di biodiesel sono gli idrossidi di metalli alcalini e carbonati di potassio.

Come è noto esistono però ancora una serie di problematiche associate al processo produttivo del biodiesel come la purificazione della glicerina (molto contaminata dal catalizzatore acido o basico) e la necessità di avere oli vegetali o grassi animali purificati. L'utilizzo di catalizzatori enzimatici al posto dei classici tenta già da tempo di risolvere questa tipologia di problemi legati ai normali processi di produzione. Il processo enzimatico utilizza la lipasi come catalizzatore biologico, potendo consumare anche olii residuali come materia prima, senza produrre sottoprodotti contaminati. Tale processo può presentare, tuttavia, diversi limiti, e a tal fine diverse aziende stanno sperimentando diversi approcci di processo per cercare di trovare le condizioni ottimali per far avvenire la reazione (temperatura, pH, ceppo di microorganismo per generare l'enzima, solvente, etc.) con l'obiettivo di rendere il processo competitivo per l'industria chimica.

In particolare le lipasi sono tra gli enzimi più efficienti per la transesterificazione quando vengono utilizzati alcoli a catena lunga, piuttosto che con metanolo o etanolo, e perciò il processo enzimatico necessita l'ausilio in questo caso di un solvente organico. Inoltre la transesterificazione enzimatica che coinvolge enzimi lipolitici come le lipasi ha attirato l'attenzione per la produzione di biodiesel in quanto produce prodotti ad alta purezza e consente un facile separazione dal sottoprodotto, glicerolo. L'impiego di lipasi immobilizzate, cellule intere immobilizzate e mezzi di

reazione non convenzionali può abbassare il costo complessivo, presentando meno problemi di lavorazione a valle, alla produzione di biodiesel.

Il principale inconveniente di tale tecnologia potrebbe però essere legato da un lato l'alto costo del catalizzatore biologico o della lipasi e dall'altro l'uso di solventi organici inquinanti. Tuttavia, ad oggi, si stanno svolgendo molti studi con l'obiettivo di aumentare la stabilità operativa dell'enzima (il riciclo nel processo discontinuo o aumentare l'uso nel processo continuo) diminuendo così l'incidenza del catalizzatore nel costo globale del processo. Inoltre si sta cercando di aumentare la sostenibilità del processo attraverso la possibilità di utilizzare mezzi di reazione "Green" non convenzionali quali i fluidi supercritici in sostituzione dei solventi organici. Pertanto i costi di lavorazione a valle del processo di produzione e i problemi ambientali associati alla produzione di biodiesel e al recupero dei sottoprodotti hanno portato più di recente alla ricerca di metodi di produzione alternativi.

Il presente progetto sarà focalizzato sulla ottimizzazione della immobilizzazione covalente di enzimi commerciali ad attività esterasica su grafene ossido (GO) al fine di realizzare un robusto sistema biocatalitico per lavorare in anidride carbonica supercritica (Sc-CO<sub>2</sub>). Il responsabile scientifico del progetto ha una esperienza pluriennale in tale ambito di ricerca e possiede attrezzature su scala di laboratorio e tecnologie per la realizzazione di trasformazioni in fase supercritica. In particolare, verrà messo a punto un supporto enzimatico a base di nanosheets di ossido di grafene (GO) decorato con nanoparticelle di ZnO, indicato come nanocomposito GO@ZnO, e caratterizzato mediante diverse tecnologie chimico-fisiche quali diffrazione di raggi X (XRD), microscopia elettronica a scansione e trasmissione (SEM e TEM), microscopia a forza atomica (AFM), spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) e termogravimetria (DSC). In questo caso si prevede di immobilizzare la lipasi da *Candida rugosa* (CRL) sui materiali nanostrutturati sia tramite legame covalente che adsorbimento fisico. In tale ambito saranno studiati sia il carico della lipasi sui supporti a base di grafene GO@ZnO in funzione della modalità di immobilizzazione che gli effetti sulla termostabilità e riutilizzabilità del catalizzatore stesso.

Il biocatalizzatore che verrà sviluppato verrà caratterizzato anche sulla base della stabilità e della possibilità di riciclo per convertire materie prime (oli acidi, oli vegetali esausti, grassi animali) attraverso reazione di esterificazione/trans esterificazione con metanolo e usando come catalizzatori enzimi di tipo Lipasi in Sc-CO<sub>2</sub>. Tutti i parametri del processo di reazione verranno ottimizzati in dettaglio al fine di ottimizzarne la resa in SCCO<sub>2</sub>. Il protocollo in Sc-CO<sub>2</sub> sviluppato verrà poi confrontato con le sintesi convenzionali attualmente utilizzate a livello industriale.

Titolo del progetto (inglese): Novel biotechnological approaches for biodiesel production

Progetto di ricerca (inglese):

Modern society is currently facing one of the worst energy crises in history. Many countries on a world scale are still heavily dependent on petroleum for the production of energy and transportation fuels, while the price per barrel is rising steadily and quickly reaching record values. Thus, the only possible solution to the crisis is to find new eco-sustainable (renewable) and economically advantageous sources for the production of alternative energy; there are many possibilities that meet the sustainability criterion, for example solar, wind, geothermal and biomass. However, the sources that also satisfy the economic criterion are few. The best solution, which meets both criteria, appears to be biodiesel. The production of biodiesel by transesterification is a reaction between a triglyceride and an alcohol which leads to the formation of a mixture of fatty acids and glycerin. To move the reaction towards the maximum possible yield and therefore have only the formation of triglycerides as a reaction product, it is possible to work in conditions of excess alcohol in the reaction medium. The use of an acid or base catalyst is as known an industrially consolidated process due to its high conversion and reaction rate. In particular, the transesterification reaction is normally carried out using basic catalysts, since they allow to obtain a much higher reaction rate than the acid one, keeping the reaction environment at 50-60 ° C. The basic inorganic catalysts that can be used for the production of biodiesel are alkali metal hydroxides and potassium carbonates. As is known, however, there are still a series of problems associated with the biodiesel production process such as the purification of glycerin (highly contaminated by the acid or basic catalyst) and the need for purified vegetable oils or animal fats. The use of enzymatic catalysts instead of the classic technology has been trying for some time to solve this type of problems related to industrial

production processes. Generally the enzymatic process uses lipases as a biological catalysts, being able to consume residual oils as a raw material, without producing contaminated by-products. This process can, however, have several limitations, and to this aim several companies are working on different process approaches to find the optimal conditions for the reactions to take place (temperature, pH, strain of microorganism to generate the enzyme, solvent, etc. .) with the aim of making the process competitive for the chemical industry. In particular, lipases are among the most efficient enzymes for transesterification when long-chain alcohols are used, rather than with methanol or ethanol, and therefore the enzymatic process requires the aid in this case of organic solvents. Furthermore, enzymatic transesterification involving lipolytic enzymes such as lipases has attracted attention for the production of biodiesel as it produces high purity products and allows for easy separation from the by-product, glycerol. The use of immobilized lipases, immobilized whole cells and unconventional reaction media can lower the overall process costs, presenting fewer downstream processing problems, to biodiesel production. The main drawback of this technology, however, could be from related on the one hand to the high cost of the biological catalyst or lipase and on the other hand to the use of polluting organic solvents. However, to date, many studies are being carried out with the aim of increasing the operational stability of the enzyme (recycling in the batch process or increasing use in the continuous process) thus decreasing the incidence of the catalyst in the overall cost of the process. Furthermore, efforts are being made to increase the sustainability of the process through the possibility of using unconventional "Green" reaction media such as supercritical fluids to replace organic solvents. Therefore, the processing costs downstream of the production process and the environmental problems associated with the production of biodiesel and the recovery of by-products have more recently led to the search for alternative production methods.

The present research project will be focused on the optimization of the covalent immobilization of commercial enzymes with esterase (lipases) activity on graphene oxide (GO) in order to create a robust biocatalytic system to work in supercritical carbon dioxide (Sc-CO<sub>2</sub>). The scientific manager of the project has many years of experience in this field of research and possesses laboratory-scale equipment and technologies for carrying out transformations in the supercritical phase. In particular, an enzymatic support based on graphene oxide (GO) nanosheets decorated with ZnO nanoparticles, indicated as GO @ ZnO nanocomposite, and characterized by different chemical-physical technologies such as X-ray diffraction (XRD) will be developed. , scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM), atomic force microscopy (AFM). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetry (DSC). In this case it is planned to immobilize the rough Candida lipase (CRL) on the nanostructured materials both by covalent bond and physical adsorption. In this context, both the lipase load on graphene-based GO @ ZnO supports as a function of the immobilization mode and the effects on the thermostability and reusability of the catalyst itself will be studied. The biocatalyst that will be developed will also be characterized on the basis of stability and the possibility of recycling to convert raw materials (acid oils, exhausted vegetable oils, animal fats) through an esterification / transesterification reaction with methanol and using lipase-type enzymes as catalysts into Sc-CO<sub>2</sub>. All the parameters of the reaction process will be optimized in detail in order to optimize the yield in SCCO<sub>2</sub>. The developed Sc-CO<sub>2</sub> protocol will then be compared with conventional syntheses currently employed at industrial level