

**APPLICAZIONE DELLA TECNICA NIR *in-line* PER IL MONITORAGGIO DI UN
PROCESSO DI IDROLISI ENZIMATICA DI AMIDO DA CEREALI:
RISULTATI PRELIMINARI**

E. Tamburini*, A. Giberti*, G. Ferrari**, T. Bernardi*, S. Vaccari*, G. Vaccari*

* *Dipartimento di Chimica, Università di Ferrara*

** *BUCHI Italia S.r.l., Assago (MI)*

Riassunto

L'applicazione descritta nel presente lavoro è legata a una problematica di grande attualità quale è quella relativa alla produzione di bioetanolo da fonti rinnovabili. Tra queste possiamo comprendere le fonti (come il mais, il grano, la segale, l'orzo) dalle quali è possibile estrarre amido che, convertito per via enzimatica in glucosio, permette di produrre etanolo per via fermentativa da utilizzarsi nel campo della autotrazione. Le fasi di trasformazione dell'amido in glucosio richiedono l'uso in sequenza di più enzimi che agiscono in condizioni di temperature e tempi di reazione diversi. E' stata ipotizzata la possibilità di seguire queste fasi di enzimazione attraverso la tecnica FT-NIR nella visione di poter monitorare e ottimizzare i reattori industriali. Al momento attuale sono stati eseguiti solo tests preliminari a livello di laboratorio allo scopo di valutare la realizzabilità del progetto. I positivi risultati ($0,89 < R^2 < 0,99$; $0,13 < SEP < 0,60$) ottenuti incoraggiano a prendere in considerazione la possibilità di utilizzare delle sonde inserite opportunamente all'interno degli enzimatori industriali e preparare curve di calibrazione che tengano conto delle particolari condizioni idrodinamiche dell'impianto.

Introduzione

Il problema relativo alle fonti di energia occupa ormai quotidianamente le pagine di attualità dei *media* oltre che di riviste specializzate (1). L'incremento vertiginoso del prezzo del petrolio, lo spettro di un suo possibile esaurimento in tempi non lunghissimi e le problematiche legate all'inquinamento ambientale in generale e all' "effetto serra" in particolare, impongono un sempre maggior interesse per le fonti di energia alternativa. Tra queste un posto particolarmente importante è riservato alle fonti rinnovabili di origine agricola che possono essere utilizzate per produrre biocarburanti ed in particolare bioetanolo. Quest'ultimo può infatti essere ottenuto per via fermentativa a partire da fonti zuccherine diverse che possono però aver bisogno di un trattamento di idrolisi se, nella materia prima utilizzata, si trovano sotto forma polimerica. E' il caso di prodotti vegetali che contengono amido (come il mais, il grano, la segale, l'orzo) che, dopo una fase di "liquefazione", deve essere idrolizzato prima a livello di destrine e quindi a glucosio secondo lo schema riportato nella **Figura 1**.

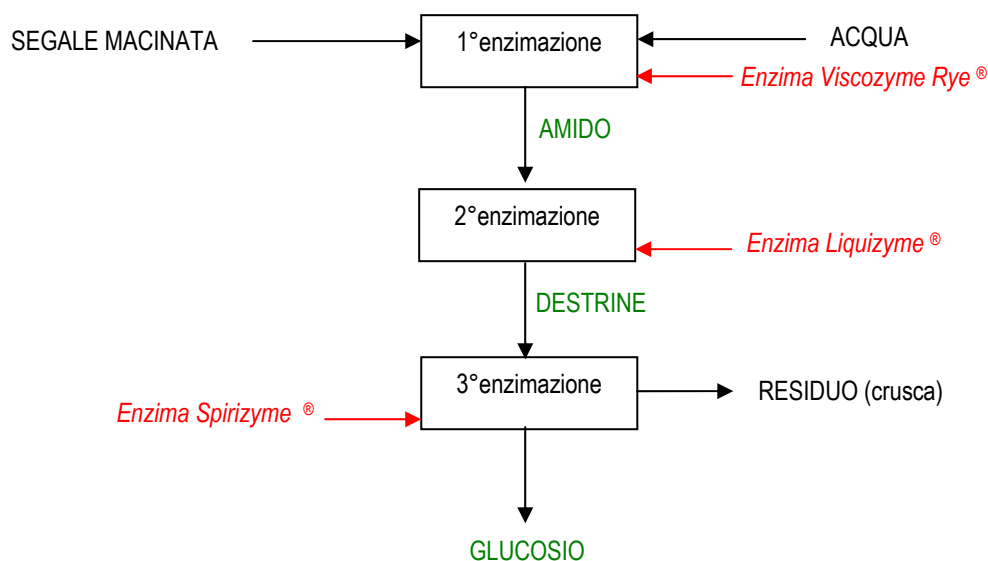


Figura 1 – Flow sheet del processo di idrolisi enzimatica a partire da segale macinata

Le tre fasi descritte nella **Figura 1** possono essere realizzate attraverso trattamenti con enzimi che, agendo in condizioni di temperatura e tempi diversi, necessitano di reattori in serie che dovranno avere dimensioni diverse nella visione di un impianto industriale continuo (**Tab. 1**).

Tabella 1. Condizioni operative degli enzimi

Enzima	Temperatura (°C)	pH	Tempo di contatto (min)
Viscozyme Rye®	50-55	5-6	30
Liquizyme®	85-88	5-6	120
Spirizyme®	60	4,3-4,5	360

Lo scopo del presente lavoro era di valutare, a livello di tests di laboratorio ed in via del tutto preliminare, la possibilità di utilizzare la tecnica NIR *in-line* per il

controllo in tempo reale delle varie fasi di enzimazione e poter ottimizzare un futuro impianto industriale.

Parte sperimentale

Le prove sono state condotte in un reattore in vetro della capacità di 3 litri munito di un sistema di agitazione, un controllo della temperatura, e immerso in un bagno termostatico come evidenziato nella **Figura 2**. In tale reattore venivano realizzate le tre fasi di enzimazione seguendo la seguente procedura: introduzione di farina di segale e acqua in un rapporto predefinito; riscaldamento fino alla temperatura prefissata (55°C) per l'azione ottimale del primo enzima; aggiunta del primo enzima (Viscozyme®Rye) nella quantità indicata dalla ditta fornitrice e mantenimento in agitazione per il tempo consigliato (30 minuti); tale enzima è costituito da una miscela di cellulasi, xilanasi e glucanasi e ha il compito di degradare i polimeri che costituiscono la parete cellulare liberando così l'amido; riscaldamento fino alla temperatura di 90°C, aggiunta del secondo enzima (Liquozyme®SC DS) che è costituito da una alfa-amilasi che ha il compito di idrolizzare l'amido in destrine (60 minuti); raffreddamento a 60°C, correzione del pH (4,5), aggiunta del terzo enzima (Spirizyme®Fuel)

costituito da una gluco-amilasi (che ha il compito di trasformare le destrine in glucosio) e mantenimento a temperatura costante per 6 ore.

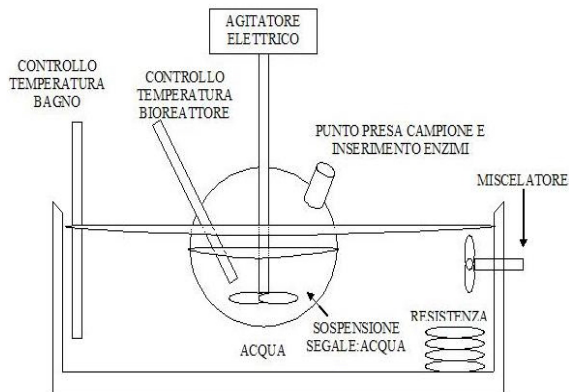


Figura 2 – *Schema dell'apparato di laboratorio*

Il sistema di analisi NIR utilizzato per questo studio è costituito dallo spettrometro FT-NIR NIRFLex N-500 (Buchi Italia S.r.l.), dotato di sonda a fibra ottiche per misure in riflettanza diffusa. Gli spettrometri a trasformata di Fourier (FT) differiscono dagli spettrometri dispersivi per l'elevata resa del fascio luminoso e contemporaneamente per la migliore risoluzione spettrale, che origina un

elevato rapporto segnale/rumore, una migliore stabilità a lungo termine ed un minor intervallo di tempo richiesto per l'analisi (secondi). La sonda è immersa nella soluzione fin dall'inizio della sua preparazione. Sulla base di tests preliminari, si è optato per un tipo di sonda in riflettanza posta in posizione perpendicolare al flusso di movimento dello "slurry" in modo tale da mantenere la sonda costantemente pulita. A tempi prefissati durante le tre fasi di enzimazione venivano raccolti gli spettri e prelevati i campioni per le analisi di riferimento. Tali campioni, immediatamente raffreddati in ghiaccio per disattivare l'azione dell'enzima e centrifugati per separare la fase solida in sospensione, venivano sottoposti ad analisi tradizionali. In particolare: per seguire la prima enzimazione, che permette di aumentare progressivamente la quantità di sostanza secca in soluzione, si è preso come riferimento il metodo refrattometrico ($^{\circ}$ Brix); per la seconda enzimazione, che porta alla produzione di destrine, si è ritenuto di seguire la variazione della concentrazione del maltotriosio utilizzando la cromatografia planare in condizioni isocratiche (lastre HPTLC di silice, eluente acetonitrile/acqua, rivelatore 2,7 diclorofluoresceina, lettura in fluorescenza a 365 nm, con scanner e software WINCATS 4.1). Sebbene tale tipo di separazione non rappresenti una condizione analitica ottimale (prove di ottimizzazione sono in corso con l'uso delle tecniche HPTLC-OPLC) ha permesso comunque di ottenere dei risultati preliminari incoraggianti; la terza enzimazione porta all'ottenimento dei prodotti di idrolisi finali dell'amido (maltosio e glucosio) che sono stati determinati via HPLC (colonna Aminex HPX-87H, eluente H₂SO₄ 0,01N) e rivelatore ad indice di rifrazione. Allo scopo di aver un numero minimo di dati su cui poter trarre alcune conclusioni, sebbene preliminari, sulla possibile applicabilità della tecnica NIR al controllo dei tre stati di enzimazione descritti, i tests enzimatici sono stati

ripetuti e i dati raccolti sono stati sottoposti a calibrazione PLS. A causa dell'ancora esiguo numero di campioni, la validazione è stata possibile soltanto come “validazione interna”.

Risultati e discussione

Nella **Figura 3** viene riportata la variazione della sostanza secca solubile (°Brix) nel tempo; risulta evidente il progressivo aumento del °Bx fino a raggiungere un valore asintotico costante.

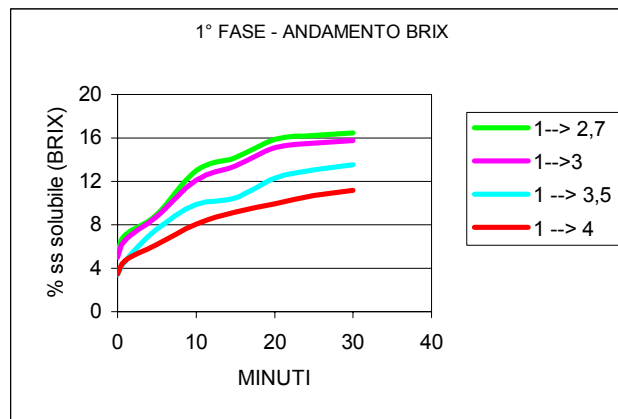


Figura 3 – Andamento del Brix in funzione del tempo di contatto dell'enzima, a diversi rapporti farina di segale:acqua (1:2,7;1:3;1:3,5;1:4)

Nella Figura 4 viene riportata la curva di calibrazione NIR ottenuta e i dati statistici essenziali da cui risulta evidente come il NIR riesca a fornire ottimi risultati in tempo reale della evoluzione del processo di “liquefazione”.

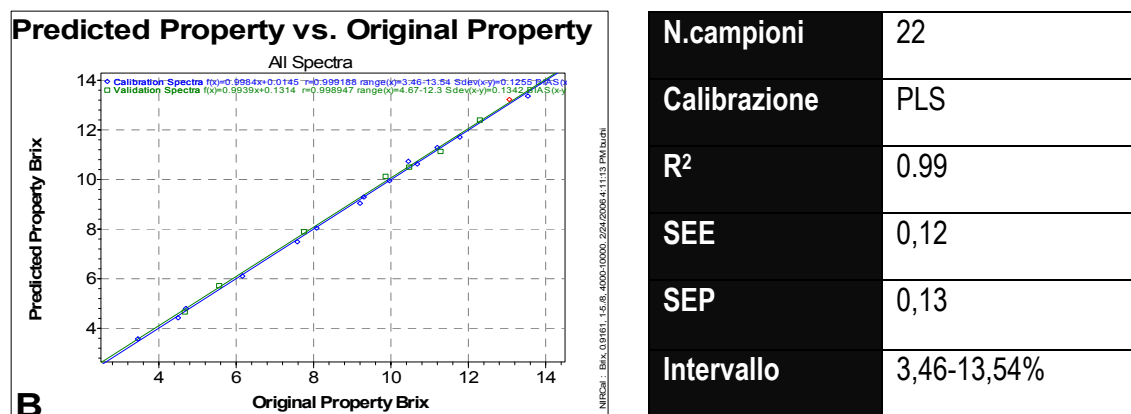


Figura 4 – Calibrazione relativa alla prima fase di enzimazione

Per la seconda fase di enzimazione si è ritenuto utile, in via preliminare, seguire la variazione della concentrazione di maltotriosio, un trisaccaride solubile come prodotto del trattamento enzimatico. L'andamento nel tempo di questo componente (se escludiamo la fase iniziale di enzimazione – **Figura 5**), al di là della dispersione statistica dei dati (CV=10%), presenta delle oscillazioni poichè il maltotriosio rappresenta una frazione di degradazione intermedia dell'amido.

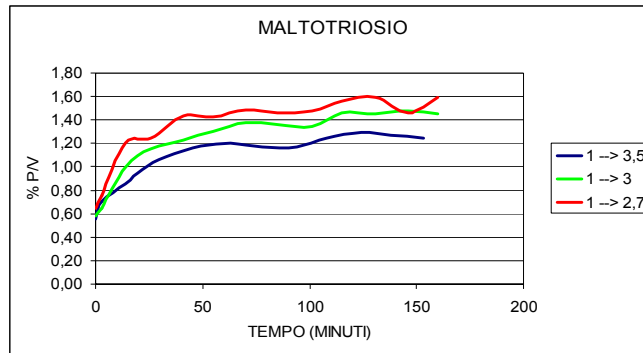


Figura 5 Andamento della concentrazione di maltotriosio in funzione del tempo di contatto dell'enzima, a diversi rapporti farina di segale:acqua (1:2,7;1:3;1:3,5)

La calibrazione (Figura 6) mostra una correlazione discreta e una capacità predittiva potenzialmente soddisfacente (SEP), tuttavia con ampio margine di miglioramento.

La correlazione peggiore di quella della calibrazione relativa alla fase 1 può essere dovuta al piccolo intervallo di variazione della concentrazione da un lato, dall'altro a causa dell'errore maggiore che affligge i dati derivanti dalla tecnica primaria impiegata (HPTLC).

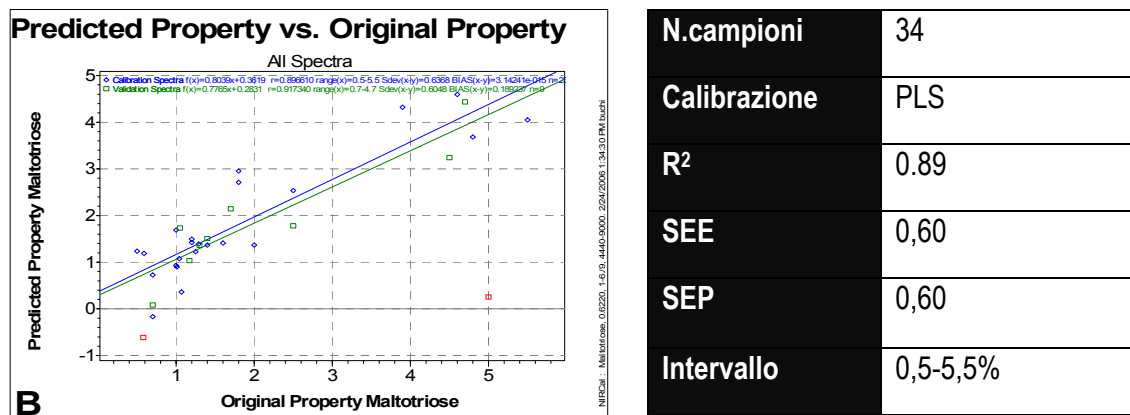


Figura 6 - Calibrazione relativa alla seconda fase di enzimazione

La terza fase di enzimazione ha lo scopo produrre glucosio a seguito dell'idrolisi di maltosio: il progressivo incremento e decremento, rispettivamente è mostrato in **Figura 7**.

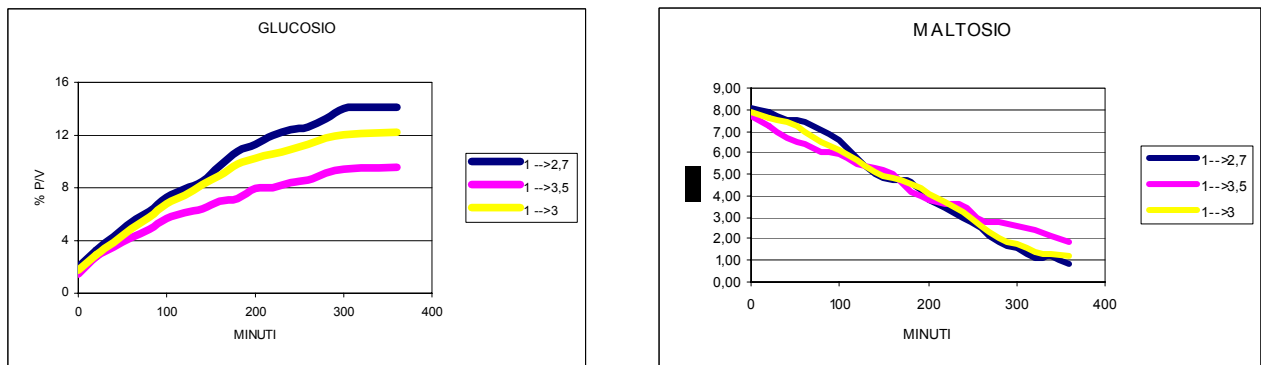
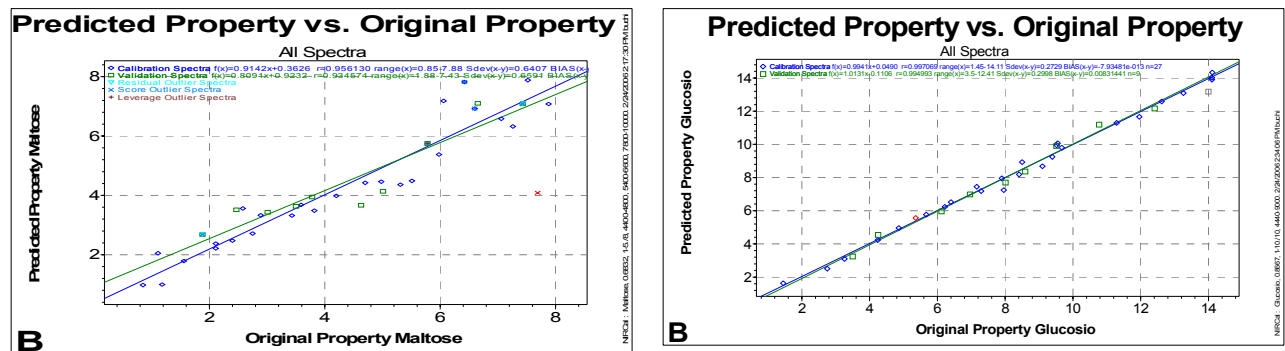


Figura 7 Andamento della concentrazione di glucosio(A) e maltosio (B) in funzione del tempo di contatto dell'enzima, a diversi rapporti farina di segale:acqua (1:2,7;1:3;1:3,5)

La possibilità di determinare, via HPLC, sia il maltosio che il glucosio, ci ha permesso di ottenere le curve di calibrazione per entrambi questi componenti (**Figura 8**).



Proprietà	N. campioni	Calibrazione	R ²	SEE	SEP	Intervallo
Maltose	37	PLS	0.95	0.6	0.6	8,11-0.78 %
Glucose	37	PLS	0.99	0.27	0.27	1.14-14.1%

Figura 8 - Calibrazioni relative alla terza fase di enzimazione

Conclusioni

I risultati ottenuti, pur essendo del tutto preliminari, sono da ritenere comunque sufficientemente indicativi della possibilità di applicare la tecnica NIR *in-line* per il controllo e la gestione di reattori industriali di enzimazione che funzionano in continuo secondo lo schema indicato nella **Figura 9**.

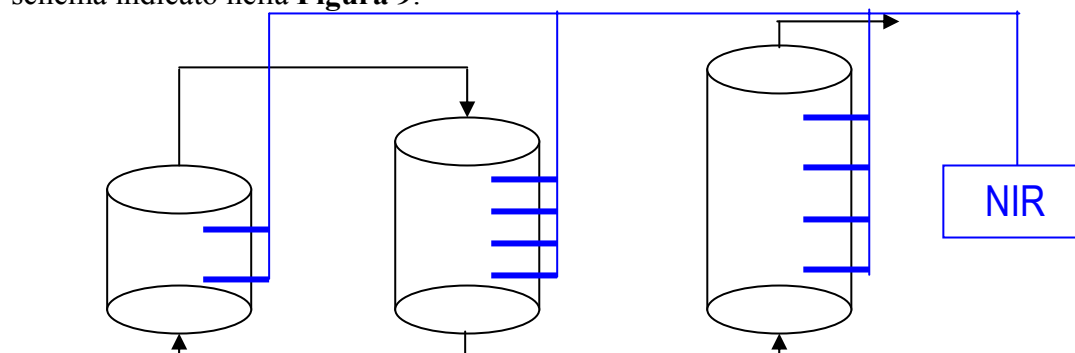


Figura 9 – Schema di un impianto sottoposto a controllo NIR.

In tale schema, sonde NIR posizionate lungo il reattore, possono monitorare in tempo reale l'evolversi dell' enzimazione, mettere in evidenza eventuali anomalie e regolare opportunamente e in modo automatico i vari flussi in modo da ottimizzare l'intero processo. Risulta ovvio che, in sede di applicazione del NIR a livello impiantistico, le curve di calibrazione dovranno essere rimesse a punto tenendo conto che le condizioni idrodinamiche del reattore industriale saranno completamente diverse, e quindi anche i corrispondenti spettri, rispetto alle condizioni di laboratorio.

Bibliografia

1. International Sugar Journal – March 2006 Volume CVIII – Issue No. 1287: “World Ethanol Review”