

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

## **Studio di enzimi immobilizzati per la produzione di metanolo a partire da anidride carbonica**



### **Relatori**

prof. Marco Piumetti  
prof. Tonia Tommasi  
prof. Carminna Ottone  
prof. Debora Fino

**Candidato**

Emanuele Berruto

Dicembre 2019



# Sommario

<b>Introduzione.....</b>	<b>III</b>
<b>1. Stato dell'arte.....</b>	<b>1</b>
1.1 Emissioni di CO <sub>2</sub> e stoccaggio .....	1
1.2 Diversi meccanismi di conversione di CO <sub>2</sub> in prodotti.....	2
1.3 CO <sub>2</sub> in metanolo tramite FDH, F <sub>ald</sub> DH e ADH.....	4
1.4 Tecniche di immobilizzazione enzimatica .....	7
1.4.1 Legame chimico .....	8
1.4.2 Contenimento .....	9
1.5 Supporti silicei mesoporosi.....	9
<b>Bibliografia .....</b>	<b>12</b>
<b>2. Materiali e metodi .....</b>	<b>17</b>
2.1 Sintesi dei supporti.....	17
2.1.1 Sintesi del supporto SBA-15 .....	17
2.1.2 Sintesi dei supporti MCF 0.5 e MCF 0.75 .....	19
2.2 Caratterizzazione dei supporti .....	20
2.2.1 Analisi mediante fisisorbimento di N <sub>2</sub> a 77 K (analisi BET).....	20
2.2.2 Analisi XRD .....	21
2.2.3 FE-SEM.....	22
2.3 Funzionalizzazione di silice mesoporosa con gruppi aldeidici.....	23
2.3.1 Funzionalizzazione con gruppi epossidici.....	23
2.3.2 Generazione dei gruppi diolo e aldeidici.....	24
2.3.3 Caratterizzazione dei gruppi aldeidici formati .....	25
2.4 Immobilizzazione enzimatica di FDH (formiato deidrogenasi) su supporti silicei mesoporosi .....	26
2.5 Misura dell'attività enzimatica di FDH (formiato deidrogenasi).....	28
2.6 Stabilità termica .....	29
2.7 Reazione tra CO <sub>2</sub> e FDH (formiato deidrogenasi) .....	31
<b>Bibliografia .....</b>	<b>35</b>
<b>3. Risultati .....</b>	<b>39</b>
3.1 Caratterizzazione dei supporti .....	39
3.1.1 Analisi BET .....	39
3.1.2 Analisi XRD .....	43
3.1.3 Analisi FE-SEM .....	45

<i>3.2 Immobilizzazione FDH</i> .....	47
3.2.1 Funzionalizzazione e immobilizzazione dell'FDH sui supporti silicei.....	47
3.2.2 Attività enzimatica .....	51
3.2.3 Ottimizzazione dell'immobilizzazione di FDH sul supporto MCF 0.75 .....	53
3.2.4 Stabilità termica.....	54
3.2.5 Reazione con la CO <sub>2</sub> .....	55
<b>4. Lavori futuri</b> .....	<b>59</b>
<b>5. Conclusioni</b> .....	<b>61</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>62</b>

## Introduzione

L'anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ) è un composto che si trova naturalmente nell'atmosfera terrestre in forma gassosa. Un secolo fa questo si trovava in concentrazioni di circa 280 ppm, ma a causa delle emissioni antropogeniche di questo gas, ad oggi la sua concentrazione è pari a 400 ppm ed è in costante aumento [1,2]. È stato riconosciuto dall'IPCC (Gruppo intergovernativo di esperti sul cambiamento climatico) che l'aumento di concentrazione di  $\text{CO}_2$  nell'atmosfera sia la causa principale del riscaldamento globale [3]. Esistono numerosi approcci per ridurre le emissioni di  $\text{CO}_2$  tra cui il miglioramento dell'efficienza energetica, l'incremento di utilizzazione di combustibili a basso tenore di carbonio, il maggiore utilizzo di energie rinnovabili e molti altri [4,5]. Tra questi il CCS (*Carbon Capture and Storage*) consente di ridurre le emissioni di  $\text{CO}_2$  dell'85-90 % da sorgenti che producono alte quantità di anidride carbonica [1,2]. Altri due metodi sono la carbonatazione e l'EOR (*Enhanced Oil Recovery*) che hanno lo scopo di intrappolare la  $\text{CO}_2$  nel sottosuolo [2]. Un altro approccio per ridurre le emissioni di anidride carbonica è rappresentato dalla conversione di questa in altri prodotti chimici [1,6]. Esistono dei metodi ben sviluppati per la conversione di  $\text{CO}_2$ , come ad esempio la produzione di urea, di acido salicilico, di monossido di carbonio (CO) e metanolo ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) [6-10]. Oltre a questi processi che adoperano catalizzatori inorganici, sono in via di sviluppo delle tecniche basate sull'utilizzo di biocatalizzatori che sono più ecosostenibili, richiedono condizioni operative meno dispendiose e presentano selettività più alte [4,5,11]. L'utilizzo di enzimi specifici per la conversione di  $\text{CO}_2$  ha riportato negli ultimi anni dei buoni risultati a livello di laboratorio. Sono stati studiati enzimi come la monossido di carbonio deidrogenasi (CODH), la ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO), l'anidrasi carbonica (CA), questi convertono la  $\text{CO}_2$  in monossido di carbonio (CODH), zuccheri semplici (RuBisCO) e che accelerano la solubilizzazione di essa (CA) [4,12-14]. Infine, si può ottenere metanolo da anidride carbonica tramite una reazione in serie catalizzata da tre diversi enzimi: FDH (formiato deidrogenasi),  $F_{ald}DH$  (formaldeide deidrogenasi) e ADH (alcol deidrogenasi). La FDH produce acido formico ( $\text{HCOOH}$ ) da anidride carbonica, la  $F_{ald}DH$  converte l'acido formico in formaldeide ( $\text{HCOH}$ ) e infine dall'ADH si ottiene metanolo ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) a partire da formaldeide [4,11]. In natura questi tre enzimi lavorano in modo inverso, cioè producono  $\text{CO}_2$  a partire da metanolo ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), ma è stato dimostrato che cambiando le condizioni di equilibrio si riesce ad ottenere la reazione desiderata [11,15]. È stato inoltre visto che confinando i tre enzimi in una matrice solida porosa risulti in una maggiore produzione di metanolo a causa dell'aumento di concentrazioni locali dei reagenti [11,15]. Sono state quindi condotte numerose prove sull'immobilizzazione di questi enzimi in diversi supporti come alginato-silice, gelatina, supporti silicei mesoporosi e molti altri [16-19]. Dato che questi biocatalizzatori (FDH,  $F_{ald}DH$  e ADH) necessitano dell'utilizzo di un cofattore (NADH), molto dispendioso da produrre, sono stati anche studiati molti metodi per la rigenerazione di questo *in situ* [4,15,20,21]. L'immobilizzazione di questi enzimi è dunque di fondamentale importanza se non necessaria per una futura applicazione a livello industriale. Tra le varie tecniche di immobilizzazione: adsorbimento, cross-linking, intrappolamento e in membrane, l'adsorbimento covalente è il metodo che aumenta maggiormente la durata e la stabilità termica del biocatalizzatore e ne consente il riutilizzo [22-24]. Inoltre, la scelta del tipo di supporto diventa di cruciale importanza, esso deve avere diverse caratteristiche che lo rendano compatibile con l'enzima e il brodo di reazione. Le silici mesoporose sono state utilizzate per l'immobilizzazione enzimatica e hanno dato dei risultati soddisfacenti, come ad esempio per l' $\alpha$ -amilasi, la tripsina, la penicillina G acilasi e molti altri [25,26]. Questi supporti si sono

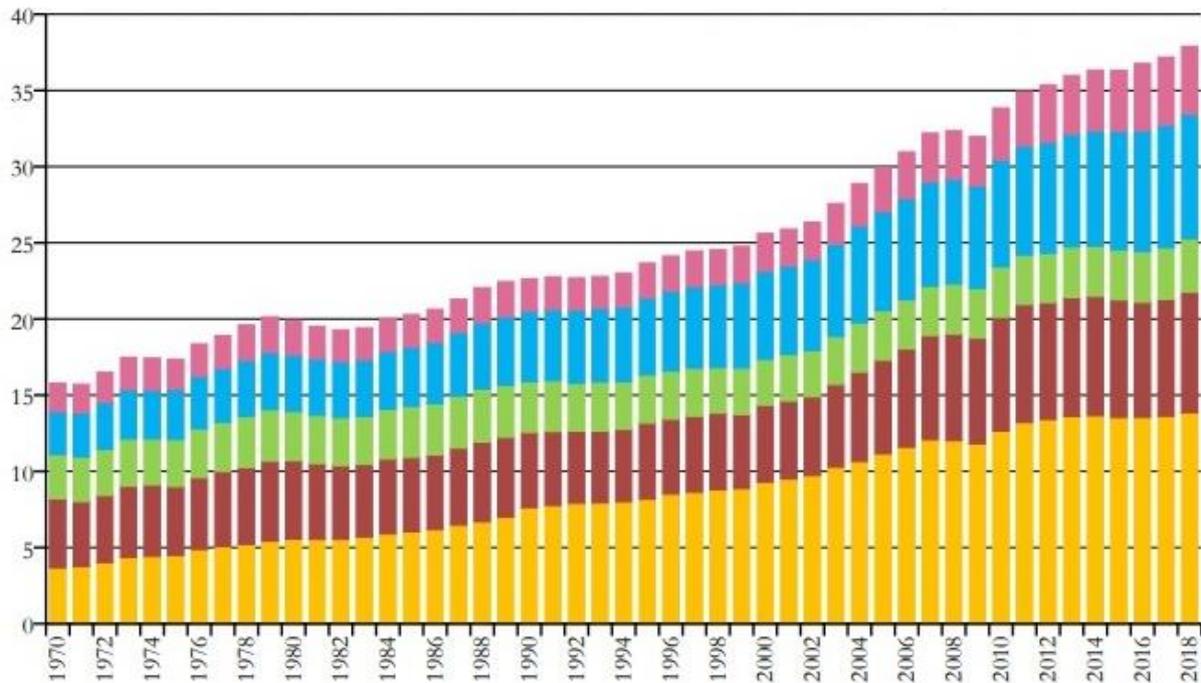
rivelate molto promettenti poiché possiedono strutture e dimensioni dei pori (2-50 nm) che risultano essere adatti per l'immobilizzazione di enzimi [27-29]. Inoltre, queste possono essere funzionalizzate con diversi gruppi funzionali per favorire la formazione di legami covalenti tra enzima e supporto [19,26,30]. Quindi scegliendo l'opportuna silice mesoporosa e il tipo di funzionalizzazione per un determinato processo enzimatico, si può ottenere un'efficace immobilizzazione della proteina all'interno dei pori e in alcuni casi anche un miglioramento delle proprietà catalitiche rispetto all'enzima solubile [25,31].

In questo lavoro sono state studiate 5 tipi di silici mesoporose come supporto per l'immobilizzazione dell'enzima formiato deidrogenasi (FDH), di cui MSU-F e MSU-H sono prodotti commerciali e SBA-15, MCF 0.5 e MCF 0.75 sono state sintetizzate. I supporti sono stati caratterizzati tramite analisi di fisisorbimento di N<sub>2</sub> (BET), diffrazione dei raggi X (XRD) e microscopio elettronico a scansione (FE-SEM) da cui sono state ricavate le informazioni riguardo le loro proprietà strutturali. Ogni supporto siliceo è stato funzionalizzato con il reagente GPTMS (3-glicidilossipropiltrimetossilano) in modo da avere sulla superficie del supporto dei gruppi aldeidici [30]. In seguito, sono stati utilizzati, per ogni tipo di silice, 2.5 mg di FDH per g di supporto per la reazione di immobilizzazione ed è stato selezionato il supporto più efficace tramite la misura di attività. Questa è stata misurata sfruttando la reazione spontanea di conversione del formiato di sodio da parte dell'FDH a CO<sub>2</sub> con la presenza del cofattore NAD<sup>+</sup>. Una volta individuato il supporto più efficace, su di esso sono state condotte delle prove per ottimizzare la quantità di enzima utilizzato nella fase di immobilizzazione. In seguito, sul sistema immobilizzato selezionato dalla prova precedente sono stati attuati dei test per verificarne la stabilità termica. Le caratteristiche più importanti prese in considerazione per i supporti silicei sono state: struttura dei pori del supporto, tubolare per MSU-H e SBA-15 e a forma di celle per MSU-F, MCF 0.5 e MCF 0.75; dimensione dei pori della silice (da 4 nm a circa 25 nm) rispetto a quelle dell'enzima (diametro = 6 nm). Queste caratteristiche sono state dimostrate in altri lavori, come fondamentali per comprendere e ottimizzare il sistema immobilizzato [19,25,31]. Infine, il sistema più efficiente e l'enzima in soluzione sono stati studiati per la conversione di CO<sub>2</sub> ad acido formico con la presenza del cofattore NADH. Sono stati individuati come principali fattori limitanti della reazione la solubilità della CO<sub>2</sub> in acqua (34 mM a 25 °C [32]) e la bassa attività dell'FDH utilizzato (derivante da *Candida Boidinii*) verso la conversione di CO<sub>2</sub> [33].

# 1. Stato dell'arte

## 1.1 Emissioni di CO<sub>2</sub> e stoccaggio

Con il continuo accrescimento di domanda mondiale di energia causato dall'aumento di popolazione, il settore energetico dovrà sostenere due importanti imprese: l'impoverimento delle riserve di combustibili fossili e il continuo aumentare delle emissioni di CO<sub>2</sub>. È stato riconosciuto dall'IPCC (Gruppo intergovernativo di esperti sul cambiamento climatico) che le emissioni di CO<sub>2</sub> sono la causa antropogenica principale del riscaldamento globale [3]. Sebbene numerose politiche per la mitigazione del cambiamento climatico siano state messe in atto recentemente, l'aumento di emissioni antropogeniche di CO<sub>2</sub> sembra inesorabile. Nell'ultimo secolo la quantità di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera è aumentata di oltre il 39%, da 280 ppm al record di 400 ppm nel 2013 con il conseguente aumento della temperatura della superficie terrestre di circa 0.8 °C. Le emissioni di anidride carbonica sono aumentate mediamente del 2.6 % per anno nel periodo 2000-2014, rispetto a una media dell'1.72 % nel periodo 1970-2000 [1,2] (Figura 1.1). Esistono numerosi approcci per ridurre le emissioni di CO<sub>2</sub> come migliorare l'efficienza energetica e promuovere un utilizzo più moderato di energia; incrementare l'utilizzo di combustibili a basso tenore di carbonio, come il gas naturale, l'idrogeno o l'energia nucleare; utilizzare energie rinnovabili come ad esempio solare, eolica e geotermica; applicare tecniche di georingegneria come l'imboschimento e il rimboschimento [4,5]. Un altro importante approccio per ridurre le emissioni di CO<sub>2</sub> è rappresentato dalla cattura e stoccaggio di questa (CCS). Il CCS (*Carbon Capture and Storage*) si basa su metodi ben conosciuti e su tecnologie sviluppate e disponibili oggi, esso può arrivare a ridurre le emissioni dell'85-90% da sorgenti ad alte emissioni di anidride carbonica come le centrali termoelettriche. Questo si basa su tre aspetti consecutivi: la cattura, la separazione e lo stoccaggio o riutilizzo della CO<sub>2</sub>. La cattura dell'anidride carbonica avviene tramite tre sistemi principali: la pre-combustione, la post-combustione e la ossicombustione. Per la separazione da altri gas di scarico si utilizzano diverse tecnologie come l'adsorbimento, l'assorbimento, l'utilizzo di membrane e altri. Infine, la CO<sub>2</sub> può essere trasportata per un suo confinamento geologico o un suo utilizzo per altri fini. [1,2] Un importante metodo sul confinamento della CO<sub>2</sub> è la carbonatazione, questa è basata sulla reazione tra CO<sub>2</sub> e metalli, come calcio e magnesio, da cui si producono dei carbonati insolubili [7]. L'EOR (*Enhanced Oil Recovery*) è un processo avanzato di recupero del petrolio in cui la CO<sub>2</sub> è introdotta nel giacimento per aumentare la quantità di greggio estraibile e di conseguenza l'anidride carbonica rimane stoccata nel giacimento in modo perenne [2].

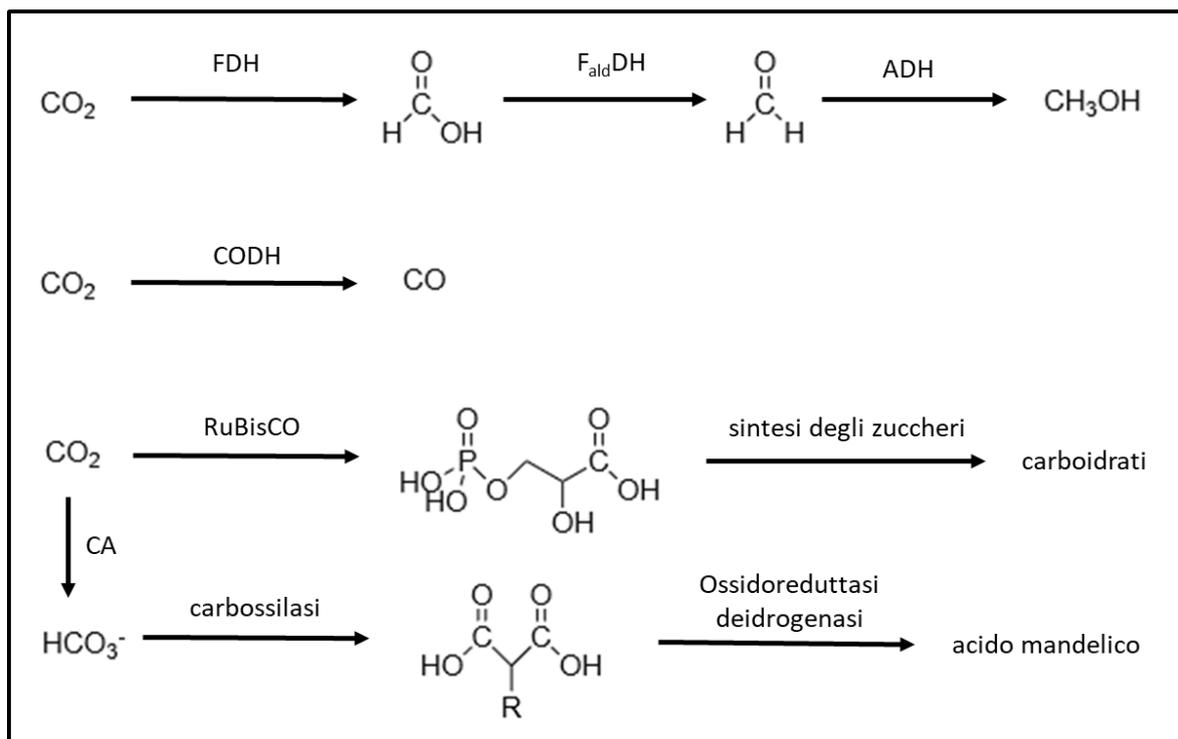


**Figura 1.1:** Produzione antropogenica di CO<sub>2</sub> annuale (GtCO<sub>2</sub>/anno): industria energetica (■), altre combustioni industriali (■), edifici (■), trasporti (■), altri settori (■).

## 1.2 Diversi meccanismi di conversione di CO<sub>2</sub> in prodotti

Un'alternativa stimolante allo stoccaggio dell'abbondante CO<sub>2</sub> in depositi naturali e in giacimenti di petrolio è l'utilizzo dell'anidride carbonica come materia prima per la produzione di prodotti chimici ad alto valore economico [1,6]. Esistono anche svariate tecnologie consolidate e utilizzate industrialmente che usano la CO<sub>2</sub> come risorsa senza convertirla, come ad esempio i sistemi di refrigerazione, la produzione di ghiaccio secco, la produzione di estintori, l'industria delle bevande gasate e molti altri [7]. Tuttavia, l'utilizzo di anidride carbonica come reagente ha due vantaggi: oltre a ridurre le emissioni di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera si ha la produzione di sostanze ad alto valore economico. Esistono già dei processi chimici inorganici in cui la CO<sub>2</sub> è convertita in altre sostanze e il più sviluppato è quello che, da ammoniaca e anidride carbonica, produce urea, usato come fertilizzante. Inoltre, questo è anche il processo che converte più CO<sub>2</sub> (circa 65 MtCO<sub>2</sub> all'anno nel 2005) [6,7]. Un altro esempio è dato dalla produzione di acido salicilico utile per la produzione di Aspirina, una medicina largamente utilizzata [6]. Esistono anche svariati processi che prevedono la conversione di CO<sub>2</sub> a CO (monossido di carbonio), quest'ultimo può essere utilizzato come materia prima per la produzione di idrocarburi tramite il processo Fischer-Tropsch [8]. Si trovano diversi processi per la conversione di anidride carbonica a monossido di carbonio come la fotoriduzione, l'elettrolisi, l'elettrocatalisi, il bi-reforming e tri-reforming e questi coinvolgono diversi tipi di catalizzatori [1,6,7]. L'acido formico (HCOOH) e la formaldeide (HCHO) sono i composti ossigenati più semplici da ottenere a partire dalla riduzione di CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Questi sono prodotti tramite dei sistemi elettrochimici e fotosintetici [9]. Un esempio rilevante è rappresentato dalla produzione di metanolo (CH<sub>3</sub>OH), infatti questo è prodotto a livello industriale a partire da gas di sintesi (CO, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>). Il processo

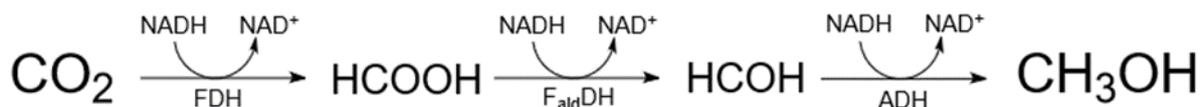
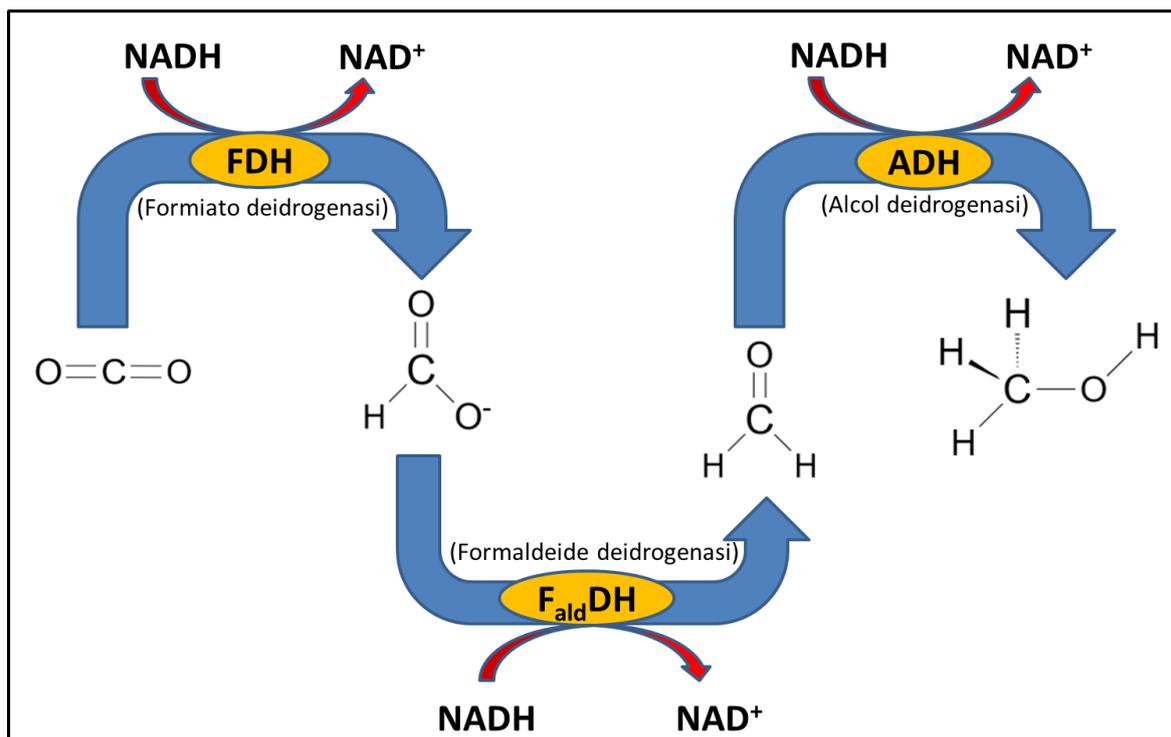
utilizzato è il Lurgi MegaMethanol che tramite catalizzatori misti formati da rame, ossido di zinco e allumina ha un'alta selettività verso il metanolo (98.8%) a 250-300 °C e 5-10 Mpa [9,10]. Tuttavia, questi processi inorganici richiedono per la maggior parte: idrogeno (H<sub>2</sub>), temperature e pressioni operative alte e presentano anche bassa selettività. Al contrario, processi che coinvolgono l'utilizzo di biocatalizzatori presentano condizioni operative meno dispendiose dal punto di vista energetico e selettività maggiori verso la CO<sub>2</sub>, senza effetti dannosi collaterali verso l'ambiente [4,5,11]. Inoltre, l'utilizzo di enzimi viene anche utilizzato per la cattura di CO<sub>2</sub> e non solo per la sua conversione [4,34]. In natura esistono svariati sistemi biologici che fissano la CO<sub>2</sub>, l'esempio più importante è rappresentato da piante, alghe e cianobatteri che utilizzano l'anidride carbonica per la fotosintesi. Inoltre, alcuni microrganismi ricavano energia direttamente dall'utilizzo di CO<sub>2</sub> (chemiotrofia) [35]. Esistono anche degli enzimi, come le carbossilasi, che utilizzano la CO<sub>2</sub> come substrato per reazioni di carbossilazione da percorsi catabolici e non appartengono a classi di microrganismi chemioautotrofi [4]. Esistono diversi enzimi che sono stati ampiamente studiati in grado di catalizzare la conversione di CO<sub>2</sub>. Ad esempio, tramite monossido di carbonio deidrogenasi (CODHs) si può convertire la CO<sub>2</sub> in CO, sono stati studiati diversi sistemi elettrochimici in grado di ottenere monossido di carbonio [4,12]. Il glucosio può anche essere ottenuto da anidride carbonica tramite un ciclo di riduzione del carbonio fotosintetico utilizzando l'enzima ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO) [4,13]. Un altro metodo per convertire la CO<sub>2</sub> è quello di trasformarla in acido carbonico (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) utilizzando un enzima chiamato anidrasi carbonica (CA). Quindi questo enzima può essere associato a processi di separazione della CO<sub>2</sub> da altri gas anche perché ha un'alta attività catalitica [4,14]. Esistono anche degli enzimi, chiamati carbossilasi, che utilizzano la CO<sub>2</sub> per introdurre un gruppo carbossilico in diversi composti organici [4]. Infine, si può ottenere metanolo da anidride carbonica tramite una reazione in serie catalizzata da tre diversi enzimi: FDH (formiato deidrogenasi), F<sub>ald</sub>DH (formaldeide deidrogenasi) e ADH (alcol deidrogenasi) [4,11]. Questa verrà descritta più nel dettaglio nel paragrafo seguente.



**Figura 1.2:** Vie biocatalitiche per la conversione di CO<sub>2</sub>. FDH: formiato deidrogenasi, F<sub>ald</sub>DH: formaldeide deidrogenasi, ADH: alcol deidrogenasi, CODH: monossido di carbonio deidrogenasi, RuBisCO: ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi/ossigenasi, CA: anidrasi carbonica, R: H, CH<sub>3</sub> [4].

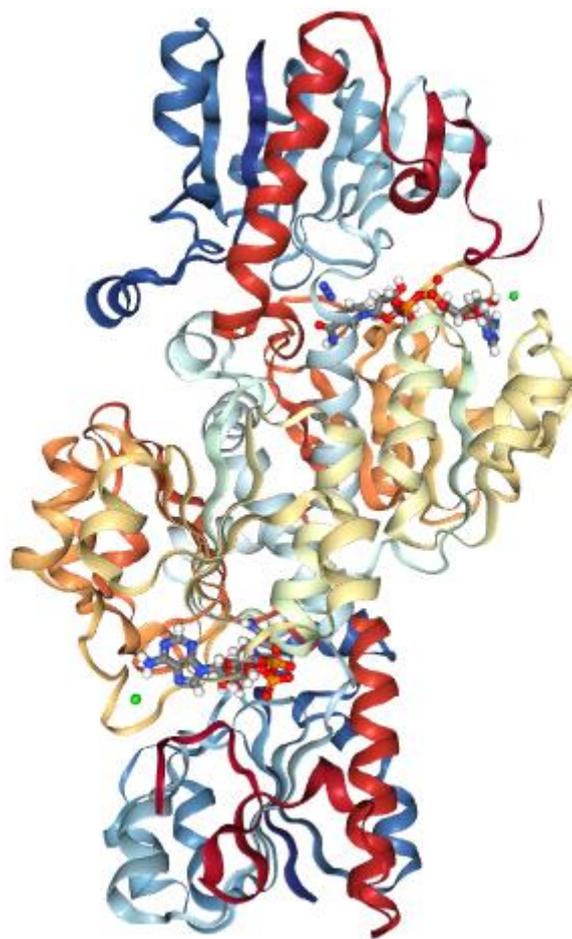
### 1.3 CO<sub>2</sub> in metanolo tramite FDH, F<sub>ald</sub>DH e ADH

Il metanolo (CH<sub>3</sub>OH) è un composto che può avere svariati utilizzi: può essere utilizzato come solvente, è un reagente in molti processi chimici e soprattutto può essere adoperato come carburante. Quindi il metanolo ha un grande interesse e il premio nobel *George Olah* ha concepito un suo possibile utilizzo futuro al posto degli idrocarburi dove il metanolo è ottenuto da processi biologici e non inquinanti [9]. Inoltre, si prevede che la domanda mondiale di metanolo cresca di molto nei prossimi anni, passando da un consumo globale di 60.7 milioni di metri cubi nel 2013 a più di 109 milioni di metri cubi nel 2023 [36]. Sviluppare un processo enzimatico e quindi ecosostenibile, in cui l'anidride carbonica viene convertita in metanolo è di grande interesse. La sequenza enzimatica di deidrogenasi (FDH, F<sub>ald</sub>DH, ADH) precedentemente introdotta, rappresenta una promettente soluzione ai classici sistemi utilizzati industrialmente [11,15]. Lo Schema 1.1 raffigura la reazione in serie in cui la formiato deidrogenasi (FDH) catalizza la conversione di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) in acido formico (HCOOH), la formaldeide deidrogenasi (F<sub>ald</sub>DH) converte l'acido formico in formaldeide (HCHO) e infine dall'alcol deidrogenasi (ADH) si ottiene metanolo (CH<sub>3</sub>OH) a partire da formaldeide. Si può notare che tutti e tre gli enzimi hanno bisogno del cofattore NADH che fornisce elettroni necessari per la reazione [4,15].



**Schema 1.1:** Reazione enzimatica in serie in cui tre enzimi (FDH, F<sub>ald</sub>DH, ADH) catalizzano la conversione di CO<sub>2</sub> a CH<sub>3</sub>OH.

In realtà la reazione che gli enzimi catalizzano naturalmente è quella inversa, dove dal metanolo si ottiene CO<sub>2</sub>, ma è stato dimostrato che la costante di equilibrio può essere cambiata di diversi ordini di grandezza per favorire la produzione di metanolo ottimizzando le condizioni di reazione [11,15]. Ci sono due tipi di FDH: quelli NAD<sup>+</sup>-dipendenti e quelli metallo-dipendenti, per i secondi il cofattore NAD<sup>+</sup>/NADH non è necessario per catalizzare le reazioni descritte precedentemente [15,33]. Tuttavia, il secondo tipo di FDH è dipendente da un metallo molto sensibile all'ossigeno che può essere Molibdeno (Mo) o Tungsteno (W) e quindi non adottabili a livello industriale [15]. Quindi per questo lavoro viene utilizzato l'FDH derivante da *Candida Boidinii* (CbFDH) che oltre ad essere tollerante all'ossigeno, è disponibile commercialmente. Le dimensioni di questo enzima si possono ricavare dalla massa molecolare di 81200 Da e con un'approssimazione a una sfera si trova che l'FDH ha un diametro di circa 5.7 nm [37,38]. Come si può vedere dalla Figura 1.3, questo FDH e gli altri NAD<sup>+</sup>-dipendenti, formano solitamente omodimeri costituiti da due monomeri identici, quindi ogni omodimero contiene due siti attivi (dove avviene la reazione di interesse) [39].



**Figura 1.3:** Struttura di CbFDH dove le molecole raffigurate rappresentano due  $\text{NAD}^+$  nei due siti attivi dell'omodimero [40].

Per quanto riguarda l'enzima  $F_{\text{ald}}\text{DH}$ , è stato visto che per la reazione descritta nello Schema 1.1, esso rappresenta lo stadio controllante della reazione, in quanto presenta bassa attività nel convertire formiato in formaldeide [31]. Questo risulta essere più grande dell'FDH con una massa di 141000 Da e approssimandolo ad una sfera presenta un diametro di oltre 7 nm [38,41]. L'ADH presenta simili dimensioni all' $F_{\text{ald}}\text{DH}$  [41]. È stato visto inoltre che i primi due enzimi (FDH e  $F_{\text{ald}}\text{DH}$ ) hanno temperature e pH ottimali simili, invece per l'ADH quei valori riducono significativamente la sua attività [19].

È stato visto che per quanto riguarda la suddetta reazione enzimatica, il confinamento dei tre enzimi in una matrice solida porosa risulti in una maggiore probabilità che le reazioni desiderate avvengano. Questo succede a causa di un complessivo aumento di concentrazioni locali dei reagenti nei pori del supporto [11,15]. Sono state quindi condotte numerose ricerche in modo da migliorare l'efficienza e la riutilizzabilità di questo sistema confinato [15]. Un sistema che ha portato buoni risultati per quanto riguarda l'attività e la riutilizzabilità è l'incapsulamento degli enzimi in una matrice di alginato-silice [16]. Un altro esempio è rappresentato dall'utilizzo di una gelatina in cui i diversi enzimi sono stati confinati in modo diverso sul supporto (incapsulamento, legame covalente, intrappolamento) [17]. È anche stato studiato un sistema in cui i tre enzimi sono immobilizzati in una membrana polimerica tramite una semplice filtrazione dovuta a una differenza di pressione [18]. Sono stati condotti degli studi sull'immobilizzazione di FDH e  $F_{\text{ald}}\text{DH}$  in supporti silicei mesoporosi e si è visto che il confinamento dei due enzimi ha garantito una conversione maggiore rispetto agli enzimi in

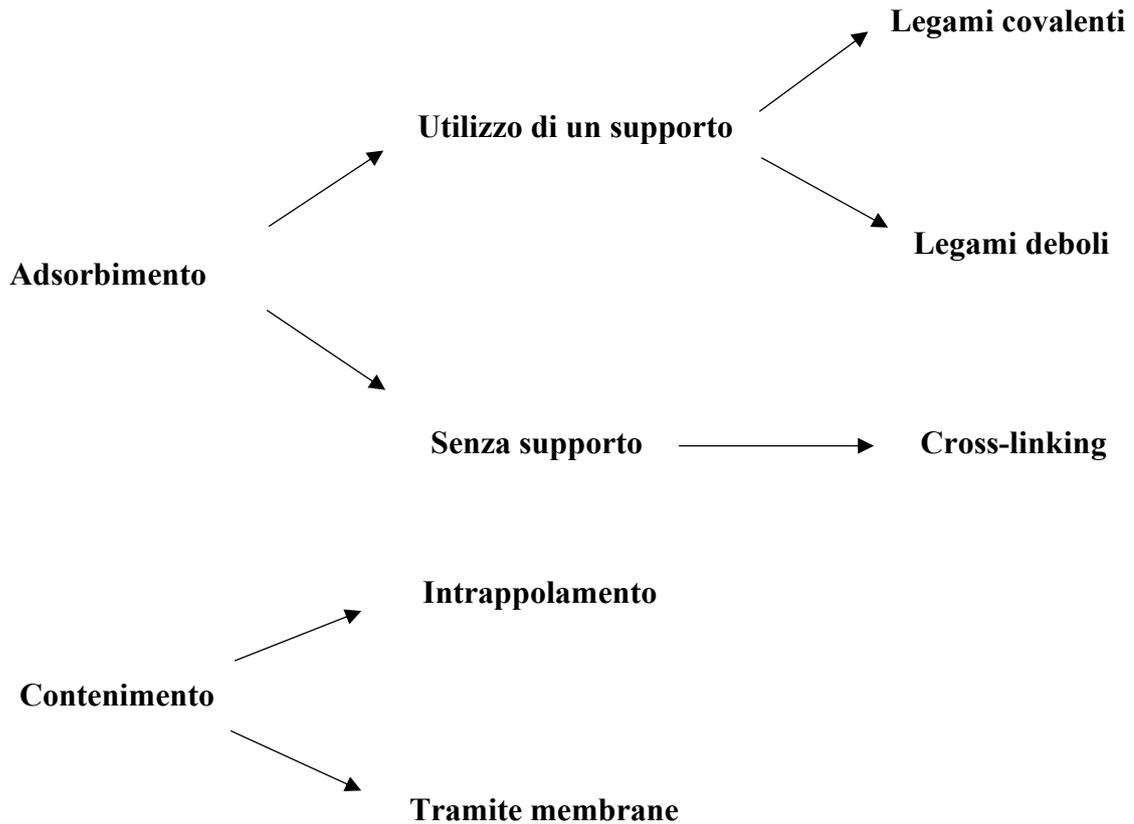
soluzione [19]. Negli ultimi anni sono stati considerati anche dei sistemi che consentono la rigenerazione del cofattore NADH/NAD<sup>+</sup>, poiché molto costoso da produrre e non utilizzabile a livello industriale se non rigenerato [4,15]. Ad esempio, sono stati creati dei sistemi fotocatalitici/biocatalitici che consentono la rigenerazione del cofattore *in situ* in nanofibre [20]. Inoltre, è stato anche verificato che un'iniezione diretta di elettroni nel sistema enzimatico immobilizzato consente al sistema di reagire senza la presenza del cofattore [21].

In conclusione, l'immobilizzazione del sistema enzimatico composto da FDH, F<sub>ald</sub>DH e ADH per la produzione di metanolo da anidride carbonica è di fondamentale importanza se non necessario per una futura applicazione a livello industriale. Nel paragrafo seguente verranno elencate le principali tecniche di immobilizzazione.

#### *1.4 Tecniche di immobilizzazione enzimatica*

L'immobilizzazione enzimatica è un processo che diventa fondamentale se si vuole utilizzare un enzima su scala industriale. Il motivo principale è rappresentato dalla sua riutilizzabilità, questo poiché la produzione di un enzima è molto costosa e il suo recupero è di fondamentale importanza. Inoltre, l'immobilizzazione permette anche un miglioramento della stabilità enzimatica in condizioni diverse da quelle fisiologiche (pH e temperatura ottimali) e in presenza di agenti inibitori. L'enzima generalmente viene immobilizzato in supporti solidi che di solito sono polimeri e materiali inorganici inerti rispetto all'enzima e alla soluzione di reazione [22-24].

Esiste un gran numero di tecniche di immobilizzazione enzimatica che possono essere divise in quelli in cui il supporto e l'enzima interagiscono attraverso legami chimici (reversibili e non) e in quelli in cui l'enzima è confinato in una matrice senza essere legato chimicamente ad esso (Schema 1.2).



**Schema 1.2:** Metodi di immobilizzazione enzimatica [22].

#### 1.4.1 Legame chimico

Questi metodi si dividono principalmente in due categorie: nella prima vengono utilizzati dei supporti dove l'enzima viene legato covalentemente o non covalentemente su di esso, nella seconda non sono previste matrici (cross-linking).

Per quanto riguarda i supporti, essi devono essere scelti in base a diverse caratteristiche come un alto rapporto superficie/volume, un'alta capacità di legarsi all'enzima, compatibilità e insolubilità nel brodo di reazione, un'alta stabilità termica e chimica, flessibilità e possibilità di riutilizzo [22].

Per l'adsorbimento tramite legami covalenti dell'enzima sulla superficie del supporto è necessario che questo possieda dei gruppi funzionali sulla superficie in modo da legarsi covalentemente con i residui dei gruppi funzionali presenti sul biocatalizzatore come -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH e -COOH. In seguito a questo processo si aumenta la durata dell'enzima e la stabilità termica, inoltre il sistema può essere riutilizzato più volte senza che l'enzima si distacchi dal supporto. Tuttavia, questo tipo di immobilizzazione può alterare le proprietà cinetiche dell'enzima, in seguito difficilmente il supporto può essere riutilizzato dopo che l'enzima si è denaturato e le rese di immobilizzazione sono relativamente basse. [22,23] Un esempio di rilevante importanza è costituito dal legame multi-covalente introducendo dei gruppi aldeidici sul supporto tramite ad esempio il GPTMS (3-glicidilossipropil trimetossilano). Sono stati studiati molti sistemi di questo tipo utilizzando agarosio come matrice e hanno dato degli ottimi risultati [22].

Il legame non covalente tra enzima e supporto avviene invece tramite dei legami deboli come ad esempio delle interazioni di van der Waals, interazioni idrofobiche e legami ionici. Tramite questo semplice metodo si possono raggiungere elevate rese di immobilizzazione, è possibile recuperare il supporto tramite il desorbimento dell'enzima e non vengono coinvolti reagenti potenzialmente dannosi. Tuttavia, gli enzimi si desorbono facilmente se introdotti in una soluzione acquosa e se le condizioni (pH, temperature, ecc...) di questo vengono alterate. [22,23]

Il cross-linking è un metodo di immobilizzazione enzimatica che non necessita di supporti. Esso si avvale di reagenti bifunzionali, come la glutaraldeide, che connettono direttamente due enzimi senza l'utilizzo di supporti inerti. Questo può avvenire sia tramite l'enzima solubile che avendo l'enzima sottoforma di cristalli. Il primo sistema però richiede condizioni molto precise durante l'immobilizzazione e gran parte dell'attività viene solitamente persa, per il secondo invece si ottengono eccellenti proprietà a discapito però di costi molto elevati. Esiste un ultimo metodo molto promettente per il cross-linking che si avvale di una precipitazione dell'enzima solubile per la formazione di aggregati prima della reazione di cross-linking con il reagente bifunzionale. [22-24]

#### 1.4.2 Contenimento

Il contenimento si divide in due principali categorie: intrappolamento e contenimento tramite membrane. Questo è un metodo irreversibile di immobilizzazione in cui l'enzima non interagisce con il supporto tramite legami, ma è trattenuto fisicamente, quindi fenomeni di denaturazione non avvengono. Il supporto presenta delle cavità appositamente progettate che permettono ai reagenti e ai prodotti di passare liberamente e all'enzima di non disperdersi in soluzione. [22-24]

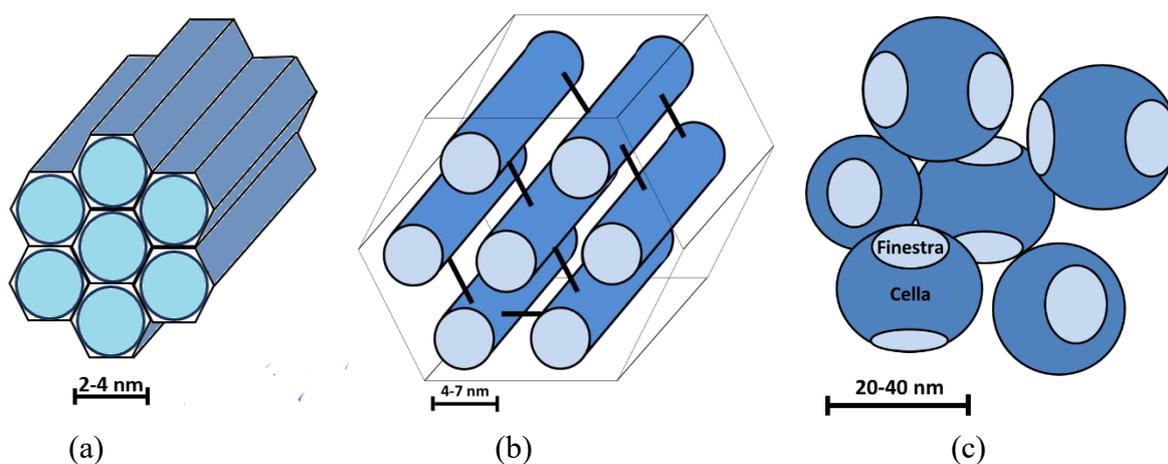
L'intrappolamento avviene dentro delle cavità di matrici solitamente polimeriche, compatte a tal punto da non far passare l'enzima. L'immobilizzazione avviene in seguito alla polimerizzazione di una soluzione monomerica in cui l'enzima è disciolto tramite stimolazione fisica o tramite dei processi chimici. I principali materiali utilizzati sono alginato, poliuretano, poliacrilammide e alcool polivinilico. Se si utilizzano materiali biologici il metodo è chiamato incapsulamento. [22,24]

Contenendo l'enzima tramite una membrana semipermeabile è possibile anche immobilizzare enzimi di tipo diverso e ottenere reazioni in cascata. È possibile ottenere la ritenzione dell'enzima nelle membrane tramite incapsulamento e tramite l'utilizzo di membrane ad ultrafiltrazione. [22]

### 1.5 Supporti silicei mesoporosi

In questo lavoro sono stati utilizzati dei supporti silicei mesoporosi con elevate aree superficiali (500-750 m<sup>2</sup>/g) per l'immobilizzazione enzimatica. Nel 1992 sono state sintetizzate le prime silici mesoporose, così classificate dalla IUPAC poiché aventi pori tra i 2 nm e i 50 nm. I primi materiali creati sono stati chiamati MCM-X (*Mobil Crystalline of Materials*) e avevano pori cilindrici ordinati secondo una geometria esagonale con dimensione tra i 2 e i 4 nm [27-29]. In seguito, altre silici mesoporose sono state sintetizzate,

come SBA-15 (*Santa Barbara amorphous-15*) e MCF (*Mesocellular Foam*), tramite l'utilizzo di polimeri formati da tre blocchi (PEO-PPO-PEO: glicole polietilenico-glicole polipropilenico-glicole polietilenico) [28]. Il primo, SBA-15, ha dei pori cilindrici di dimensioni di circa 5 nm ordinati spazialmente con una geometria esagonale, sintetizzati con il Pluronic P123 come polimero precursore [27,28]. Il secondo invece viene sintetizzato aggiungendo un cosolvente organico (mesitilene) alla procedura di dell'SBA-15, questo permette una trasformazione strutturale del supporto. In questo modo l'MCF ha una struttura tridimensionale "spugnosa" formata da celle sferiche interconnesse fra di loro tramite dei pori aventi dimensione di circa 20 nm con aperture di diametro maggiore di 10 nm [28,42] (Figura 1.4). Inoltre, i supporti MCF possono essere sintetizzati con differenti dimensioni dei pori variando il rapporto mesitilene/P123 [31,43].



**Figura 1.4:** Struttura dei supporti silicei mesoporosi: MCM-41 (a), SBA-15 (b), MCF (c)

Questi materiali sono stati ampiamente studiati come supporto per ossidi metallici e metalli per la catalizzazione di diverse reazioni. Ad esempio, MCM-41 e SBA-15 sono stati utilizzati come supporti per il Rodio (Rh) per la decomposizione di  $N_2O$  [44]. In altri lavori le silici mesoporose sono state sintetizzate con Vanadio (V) per la deidrogenazione ossidativa del propano e sono emersi buoni risultati [45-47]. Inoltre, per la loro particolare struttura mesoporosa, in cui i pori appunto variano dai 2 ai 50 nm, le silici mesoporose risultano essere degli interessanti supporti per l'immobilizzazione di enzimi. Questi supporti possiedono anche delle ottime proprietà meccaniche che permettono al catalizzatore di sopportare delle condizioni operative dove sono presenti sforzi di taglio e compressione maggiori rispetto ad altri supporti di origine biologica. Infatti, questi materiali sono stati utilizzati con successo per questo scopo in applicazioni analitiche e come sensori [25,26]. In particolare, è stato visto che l'SBA-15 e l'MCF sono degli efficienti supporti per l'immobilizzazione tramite legami covalenti per diversi enzimi, come l' $\alpha$ -amilasi, la tripsina, la penicillina G acilasi e molti altri (25,26). Per ottenere questo tipo di immobilizzazione, la silice viene funzionalizzata mediante dei gruppi funzionali introdotti sulla sua superficie da reagenti specifici come ad esempio APTES (amminopropiltrimetossisilano), MTPS (3-mercaptopropiltrimetossisilano) e GPTMS (3-glicidilossipropiltrimetossisilano) [19,26,30]. In particolare, è stato visto che la funzionalizzazione con il GPTMS, la quale introduce dei gruppi aldeidici sulla superficie del supporto, è molto efficiente nell'immobilizzazione e stabilizzazione enzimatica in quanto i

gruppi aldeidici sono molto reattivi con i terminali amminici non ionizzati dell'enzima non ancora immobilizzato [30]. Inoltre, i gruppi aldeidici introdotti presentano un basso ingombro sterico nella reazione con le proteine e sono piuttosto stabili a pH alcalini. Infatti, si formano forti legami tra l'enzima e il supporto e questo causa un irrigidimento dell'enzima, quindi un'alta stabilità termica [30]. In conclusione, questi supporti sono molto interessanti per l'immobilizzazione di enzimi poiché esistono in diverse forme con diverse dimensioni dei pori. Quindi scegliendo l'opportuna silice mesoporosa per un determinato processo enzimatico, si può ottenere un'efficace immobilizzazione della proteina all'interno dei pori e in alcuni casi anche un miglioramento delle proprietà catalitiche [25,31]. In questa tesi verrà studiato l'effetto dell'immobilizzazione sulle proprietà catalitiche sulla stabilità dell'FDH (formiato deidrogenasi). Come detto prima, l'enzima in questione ha un diametro di quasi 6 nm, di conseguenza le silici mesoporose rappresentano un interessante supporto per l'immobilizzazione dato che possiedono dei pori di dimensioni dai 2 ai 50 nm.

## Bibliografia

- [1]. Mac Dowell N., Fennell P. S., Shah N., Maitland G. C. The role of CO<sub>2</sub> capture and utilization in mitigating climate change. *Nature Climate Change* 7. 2017, 243–249.
- [2]. Leung D. Y. C., Caramanna G., Maroto-Valer M. An overview of current status of carbon dioxide capture and storage technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 39. 2014, 426-443.
- [3]. Fraccascia L., Giannoccaro I. Analyzing CO<sub>2</sub> emissions flows in the world economy using Global Emission Chains and Global Emission Trees. *Journal of Cleaner Production* 234. 2019, 1399-1420.
- [4]. Van Duc Long N., Lee J., Koo K., Luis P., Lee M. Recent Progress and Novel Applications in Enzymatic Conversion of Carbon Dioxide. *Energies* 2017 10. 2017, 473-492.
- [5]. Barin R., Biria D., Rashid-Nadimi S., Asadollahi M. A. Enzymatic CO<sub>2</sub> reduction to formate by formate dehydrogenase from *Candida boidinii* coupling with direct electrochemical regeneration of NADH. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization* 28. 2018, 117–125.
- [6]. Song C. Global challenges and strategies for control, conversion and utilization of CO<sub>2</sub> for sustainable development involving energy, catalysis, adsorption and chemical processing. *Catalysis Today* 115. 2006, 2-32.
- [7]. Mazzotti M., Abanades J. C., Allam R., Lackner K. S. Chapter 7: Mineral carbonation and industrial uses of carbon dioxide. *IPCC Special Report on Carbon dioxide Capture and Storage*. 2005. Cambridge University Press. Cambridge (UK)
- [8]. Technology, Emerging fuel. (Online) (Visualizzato il 8 Novembre 2019.) <http://www.fischer-tropsch.org/>.
- [9]. Hu B., Guild A. C., Suib L. S. Thermal, electrochemical, and photochemical conversion of CO<sub>2</sub> to fuels and value-added products. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization* 1. 2013, 18-27.
- [10]. Pontzena F., Liebnerb W., Gronemannb V., Rothaemela M., Ahlersb B. CO<sub>2</sub> -based methanol and DME – Efficient technologies for industrial scale production. *Catalysis Today* 171. 2011, 242-250.
- [11]. Obert R., Dave B. C. Enzymatic Conversion of Carbon Dioxide to Methanol: Enhanced Methanol Production in Silica Sol-Gel Matrices. *Journal of the American Chemical Society* 121. 1999, 12192-12193.
- [12]. Woolerton T. W., Sheard S., Reisner E., Pierce E., Ragsdale S. W., Armstrong F. A. Efficient and clean photoreduction of CO<sub>2</sub> to CO by enzyme-modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles using visible light. *Journal of the American Chemical Society* 132. 2010, 2132–2133.

- [13]. Bassham J. A., Calvin M. The path of carbon in photosynthesis. In *Die CO<sub>2</sub>-Assimilation/The Assimilation of Carbon Dioxide. Encyclopedia of Plant Physiology 532 (5)*. Springer: Berlin/Heidelberg. 1960, 884-922.
- [14]. Lindskog S., Coleman J. E. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70. 1973, 2505–2508.
- [15]. Marpani F., Pinelo M., Meyer A. S. Enzymatic conversion of CO<sub>2</sub> to CH<sub>3</sub>OH via reverse dehydrogenase cascade biocatalysis: Quantitative comparison of efficiencies of immobilized enzyme systems. *Biochemical Engineering Journal* 127. 2017, 217–228.
- [16]. Xu S., Lu Y., Li J., Jiang Z., Wu H. Efficient conversion of CO<sub>2</sub> to methanol catalyzed by three dehydrogenases Co-encapsulated in an alginate-silica (ALG-SiO<sub>2</sub>) hybrid gel. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 45. 2006, 4567–4573.
- [17]. Wang X., Li Z. , Shi J. , Wu H., Jiang Z., Zhang W. Bioinspired approach to multienzyme cascade system construction for efficient carbon dioxide reduction. *ACS Catalysis* 4 . 2014, 962–972.
- [18]. Luo J., Meyer A.vS., Mateiu R. V., Pinelo M. Cascade catalysis in membranes with enzyme immobilization for multi-enzymatic conversion of CO<sub>2</sub> to methanol. *New Biotechnology* 32. 2015, 319-327.
- [19]. Nabavi Zadeh P. S., Valle Gomes M. Z., Åkerman B., Palmqvist A. Förster resonance energy transfer study of the improved biocatalytic conversion of CO<sub>2</sub> to formaldehyde by co-immobilization of enzymes in siliceous mesostructured cellular foams. *ACS Catalysis* 8. 2018, 7251-7260.
- [20]. Ji X., Su Z., Wang P., Ma G., Zhang S. Tethering of nicotinamide adenine dinucleotide inside hollow nanofibers for high-yield synthesis of methanol from carbon dioxide catalyzed by coencapsulated multienzymes. *ACS Nano* 9. 2015 , 4600–4610.
- [21]. Schlager S., Dumitru L. M., Haberbauer M., Fuchsbauer A., Neugebauer H., Hiemetsberger D., Wagner A., Portenkirchner E., Sariciftci N. S. Electrochemical reduction of carbon dioxide to methanol by direct injection of electrons into immobilized enzymes on a modified electrode. *ChemSusChem* 9. 2016, 631–635.
- [22]. Illanes A. Chapter 4: Heterogeneous Enzyme Kinetics. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Valparaíso (Cile). Springer, 2008.
- [23]. Datta S., Christena L. R., Rajaram Y. R. S.,. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* 3. 2013, 1-9.
- [24]. Mohamad N. R., Marzuki N. H. C., Buang N. A., Huyop F., Wahab R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 29. 2015, 205-220.

- [25]. Balistreri N., Gaboriau D., Jolivalt C. Launaya F. Covalent immobilization of glucose oxidase on mesocellular silicafoams: Characterization and stability towards temperature and organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 127. 2016, 26-33.
- [26]. Kannana K., Jasra R. V. Immobilization of alkaline serine endopeptidase from *Bacillus licheniformis* on SBA-15 and MCF by surface covalent binding. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 56. 2009, 34-40.
- [27]. Johansson E. M. Controlling the Pore Size and Morphology of Mesoporous Silica. *Department of Physics, Chemistry and Biology (IFM), Linköping University*. 2010.
- [28]. Lettow J. S., Han Y. J., Schmidt-Winkel P., Yang P., Zhao D., Stucky G. D., Ying J. Y. Hexagonal to Mesocellular Foam Phase Transition in Polymer-Templated Mesoporous Silicas. *Langmuir* 16. 2000, 8291-8295.
- [29]. Drenzo F., Cambon H., Dutarte R. A 28-years-old synthesis of micelle-templated mesoporous silica. *Microporous Materials* 10. 1997, 283-386.
- [30]. Bernal C., Sierra L., Mesa M. Improvement of thermal stability of B-galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macro-mesoporous silica. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 84. 2012, 166-172.
- [31]. Valle Gomes M. Z., Palmqvist A. Immobilization of formaldehyde dehydrogenase in tailored siliceous mesostructured cellular foams and evaluation of its activity for conversion of formate to formaldehyde. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 163. 2018, 41-46.
- [32]. Kim Y., Leeb S., Oh B. Enhancement of formic acid production from CO<sub>2</sub> in formate dehydrogenase reaction using nanoparticles. *RSC Advances* 6. 2016, 109978-109982.
- [33]. Choe H., Joo J. C., Cho D. H., Kim M. H., Lee S. H., Jung K. D., Kim Y. H. Efficient CO<sub>2</sub>-Reducing Activity of NAD-Dependent Formate Dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. KNK65MA for Formate Production from CO Gas. *PLoS ONE* 9. 2014, 7-17.
- [34]. Yong J. K. J., Stevens G. W., Caruso F., Kentish S. E. The use of carbonic anhydrase to accelerate carbon dioxide capture processes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 90. 2015, 3-10.
- [35]. Appel A. M., Bercaw J. E., Bocarsly A. B., Dobbek H. e altri. Frontiers, Opportunities, and Challenges in Biochemical and Chemical Catalysis of CO<sub>2</sub> Fixation. *American Chemical Society*. 2013, 6622-6654.
- [36]. Markit, IHS. Driven by China, Global Methanol Demand to Rise Nearly 80 Percent by 2023; North America Marks Return as "Production Powerhouse". (Online) London 2014. (Visualizzato il 22 Ottobre 2019.) <https://news.ihsmarkit.com/press-release/chemicals/driven-china-global-methanol-demand-rise-nearly-80-percent-2023-north-america>.

- [37]. Bolivar J. M., Wilson L., Ferrarotti S. A., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M., Mateo C. Stabilization of a Formate Dehydrogenase by Covalent Immobilization on Highly Activated Glyoxyl-Agarose Supports. *Biomacromolecules*. 7, 2006, 673-669.
- [38]. Erickson H. P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biological Procedures Online*. 2009.
- [39]. Schirwitz K., ANDREA Schmidt A., Lamzin V. S. High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Protein Science* 16. 2007 , 1146–1156.
- [40]. Guo Q., Gakhar L., Wickersham K., Francis K., Vardi-Kilshtain A., Major D.T., Cheatum C.M., Kohen A. Structural and Kinetic Studies of Formate Dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Biochemistry* 55. 2016, 2760-2771.
- [41]. Tanaka N., Kusakabe Y., Ito K., Yoshimoto T., Nakamura K. T. Crystal structure of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: the structural origin of the tightly bound cofactor in nicotinoprotein dehydrogenases. *Journal of Molecular Biology* 324 . 2002, 519–533.
- [42]. Kim H., Jung J. C., Yeom S. H., Lee K., Yi J., Song I. K. Immobilization of a heteropolyacid catalyst on the aminopropyl-functionalized mesostructured cellular foam (MCF) silica. *Materials Research Bulletin* 42. 2007, 2132–2142.
- [43]. Schmidt-Winkel P., Lukens Jr. W. W., Yang P., Margolese D. I., Lettow J. S., Microemulsion Templating of Siliceous Mesostructured Cellular Foams with Well-Defined Ultralarge Mesopores. *Chemistry of Materials* 12. 2007, 686-696.
- [44]. Hussain M., Fino D., Russo N. N<sub>2</sub>O decomposition by mesoporous silica supported Rh catalysts. *Journal of Hazardous Materials* 211-212. 2012, 255- 265.
- [45]. Liu Y., Feng w., Li T., He H., Dai W., Huang W., Cao Y., Fan K. Structure and catalytic properties of vanadium oxide supported on mesocellulose silica foams (MCF) for the oxidative dehydrogenation of propane to propylene. *Journal of Catalysis* 239. 2006, 125-136.
- [46]. Piumetti M., Bonelli B., Massiani P., Dzwigaj S., Rossetti I., Casale S., Gaberova L., Armandi M., Garrone E. Effect of vanadium dispersion and support properties on the catalytic activity of V-SBA-15 and V-MCF mesoporous materials prepared by direct synthesis. *Catalysis Today* 176. 2011, 458-464.
- [47]. Piumetti M., Bonelli B., Massiani P., Dzwigaj S., Rossetti I., Casale S., Armandi M., Thomas C., Garrone E. Effect of vanadium dispersion and of support properties on the catalytic activity of V-containing silicas. *Catalysis Today* 179. 2012, 140-148.



## 2. Materiali e metodi

### 2.1 Sintesi dei supporti

Per questa tesi sono stati utilizzati 5 diversi supporti silicei mesoporosi: MSU-F, MSU-H, SBA-15, MCF 0.5 e MCF 0.75. I primi due sono disponibili commercialmente, invece si riporta di seguito la procedura per la sintetizzazione di SBA-15 e MCF (0.5 e 0.75).

#### 2.1.1 Sintesi del supporto SBA-15

Si preparano 250 ml di una soluzione acquosa di HCl 2 M e in seguito si diluiscono 160 ml della soluzione acida con 30 ml di acqua deionizzata in un becher. Successivamente, si aggiungono 4 g di Pluronic 123 ( $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_{70}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}\text{H}$ ) e si mantiene in agitazione la soluzione, a 35 °C, per 5 h in modo da permettere al Pluronic di dissolversi. Il Pluronic 123 è un polimero anfifilico, cioè possiede gruppi sia idrofobi che idrofili, quindi superata una concentrazione critica esso forma micelle. Questa caratteristica permette all'SBA-15 di avere una struttura regolare, che si forma attorno a queste micelle [1-3]. In seguito, si aggiungono alla soluzione 8,5 g di TEOS (tetraetossisilano al 99% in peso,  $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$ ) tramite una pipetta di vetro goccia a goccia per favorire la completa dispersione del composto. Si lascia la soluzione in agitazione, a 35 °C per 24 h [3-5]. Il TEOS agisce da precursore e grazie alla sua natura idrofoba, si inserisce all'interno delle micelle di Pluronic 123 e inizia a polimerizzare, questo processo consente alle micelle di assumere una forma allungata [1,6]. In seguito, si prosegue con il trattamento termico della soluzione in forno a 100 °C per 24 h, questo comporta un aumento della dimensione dei pori del supporto. Una volta che il trattamento è terminato e la soluzione si è raffreddata, questa viene lavata e centrifugata per ridurre l'acidità, poi si lascia essiccare il prodotto in stufa a 60 °C per 24 h [3,6]. Infine, si procede con la calcinazione del prodotto mantenuto in un forno per 5 h a 550 °C, questo passaggio ha lo scopo di liberare i pori dell'SBA-15 dai tensioattivi e dall'acqua presenti [1,6] (Schema 2.1). La struttura del supporto è rappresentata nella Figura 2.1, si può notare come i pori abbiano struttura tubolare 2D, siano raggruppati in strutture esagonali e siano interconnessi da micro canali [7].

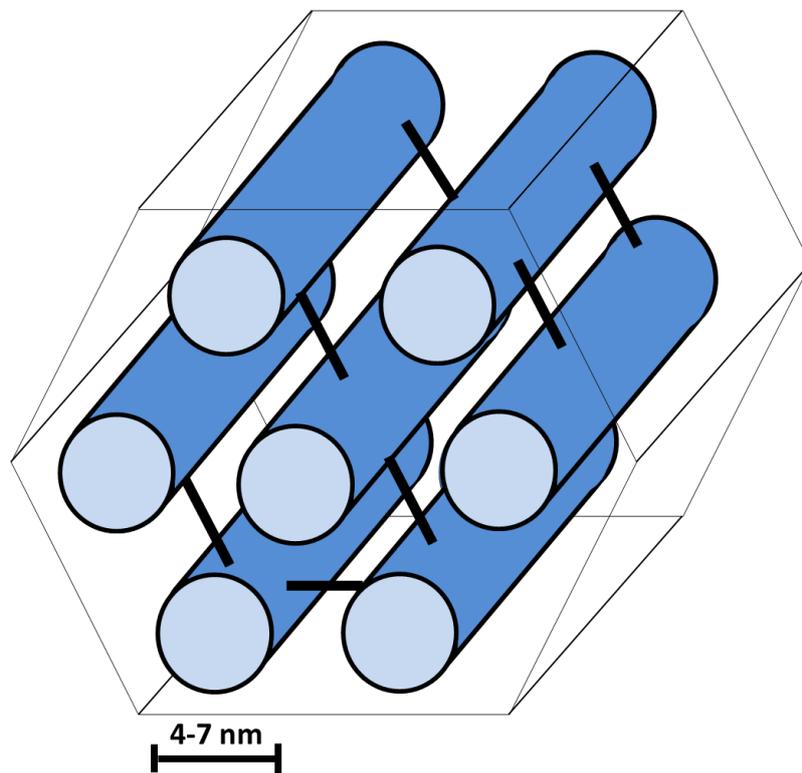
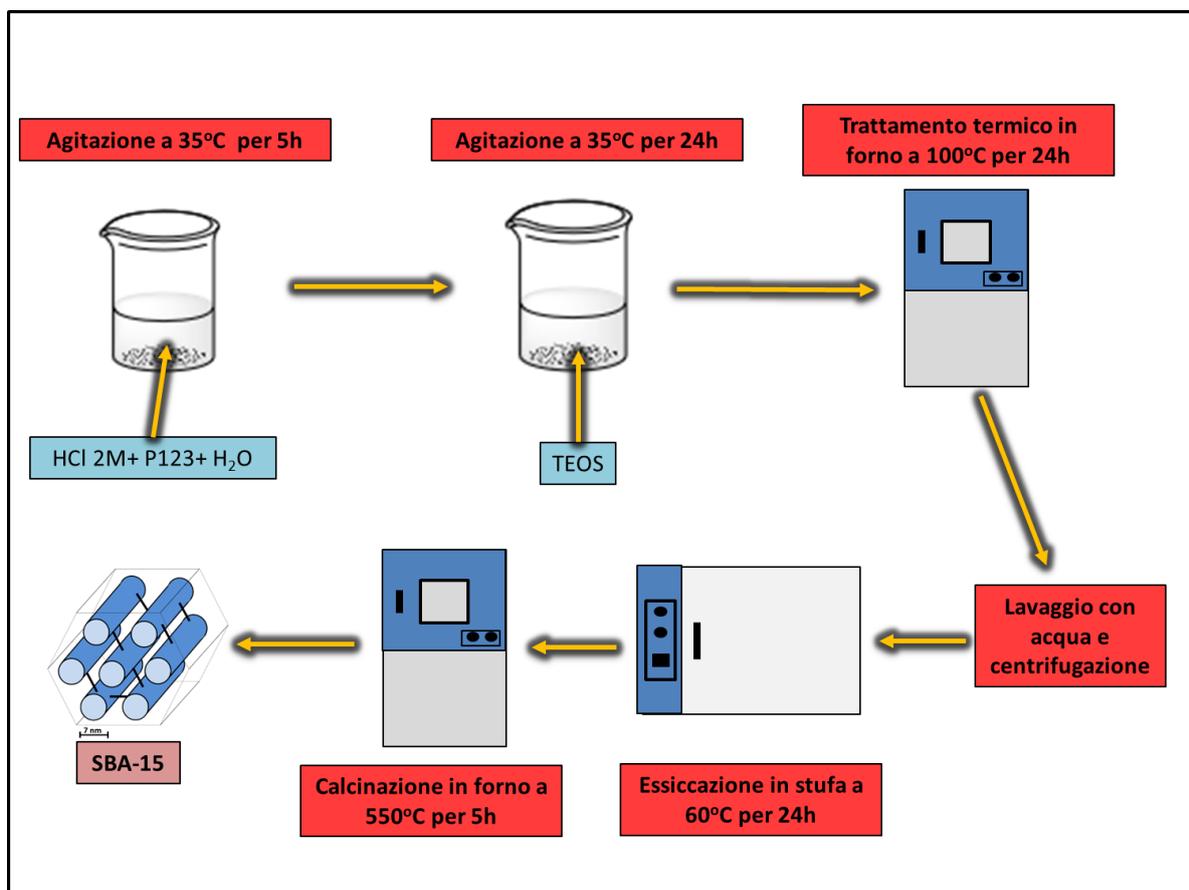


Figura 2.1: Struttura dei pori di SBA-15.



Schema 2.1: Schema di sintesi di SBA-15.

### 2.1.2 Sintesi dei supporti MCF 0.5 e MCF 0.75

Si preparano 250 ml di una soluzione acquosa di HCl 2 M e in seguito si diluiscono 160 ml della soluzione acida con 30 ml di acqua deionizzata in un becher. Successivamente, si aggiungono 4 g di Pluronic 123 ( $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_{70}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}\text{H}$ ) e si mantiene in agitazione, a 35 °C, per 1 h in modo da rendere omogenea la soluzione [7-9]. In seguito, si aggiungono 2 ml o 3 ml di mesitilene (1,3,5 – trimetilbenzene,  $\text{C}_9\text{H}_{12}$ , 98% in peso) goccia a goccia, tramite una pipetta di vetro e si lascia in agitazione per 1 h a 35 °C. Nel primo caso il rapporto massico Mesitilene/Pluronic è di 0.5 e quindi si forma MCF 0.5, nel secondo il rapporto massico Mesitilene/Pluronic è di 0.75 e quindi si forma MCF 0.75. Il mesitilene consente alle micelle cilindriche, vedi sintesi di SBA-15, di assumere una forma circolare e di aumentare la dimensione dei pori del supporto [8,10]. Come per l'SBA-15, si aggiungono, goccia a goccia, 8.5 g di TEOS (tetraetossisilano al 99% in peso,  $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$ ) tramite una pipetta di vetro e si lascia in agitazione per 24 h a 35 °C la soluzione. Terminato questo passaggio, si procede con il trattamento termico a 100 °C per 24 h in forno, il processo permette un aumento della dimensione dei pori delle sfere di silice [7,8,10]. Una volta che il trattamento è terminato e la soluzione si è raffreddata, questa viene lavata e centrifugata per ridurre l'acidità, poi si lascia essiccare il prodotto in stufa a 60 °C per 24 h. L'ultimo passaggio della sintesi dell'MCF è rappresentato dalla calcinazione che avviene a 500 °C per 6 h. Questo passaggio ha lo scopo, come per l'SBA-15, di liberare i pori dai tensioattivi e dall'acqua presenti [7,8] (Schema 2.2). La struttura dell'MCF è raffigurata nella Figura 2.2, si può notare come i pori abbiano una struttura 3D all'interno delle sfere e da letteratura è noto che sono più grandi dei pori dell'SBA-15 [7].

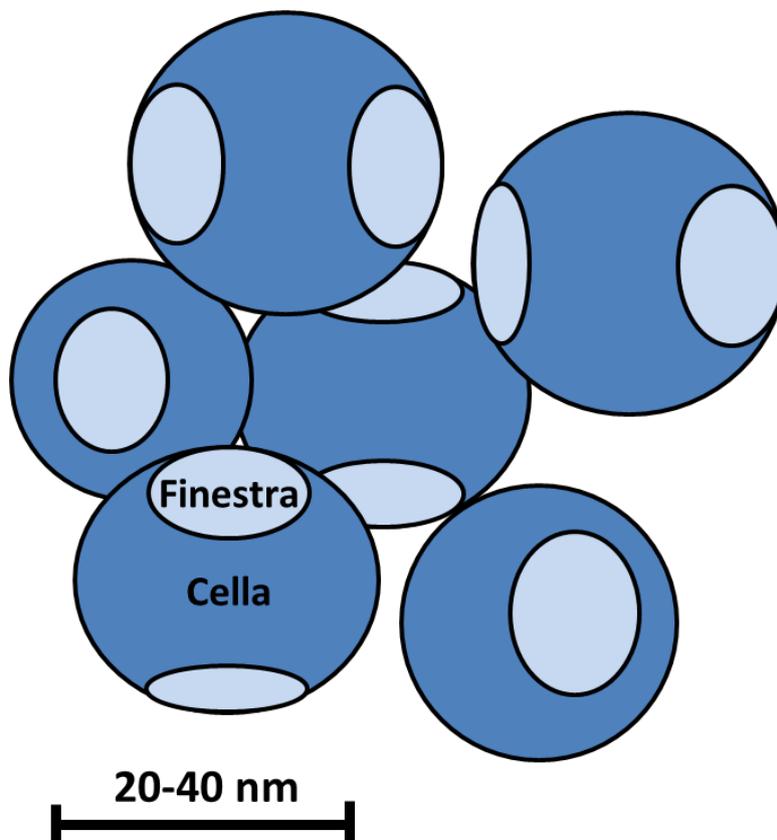
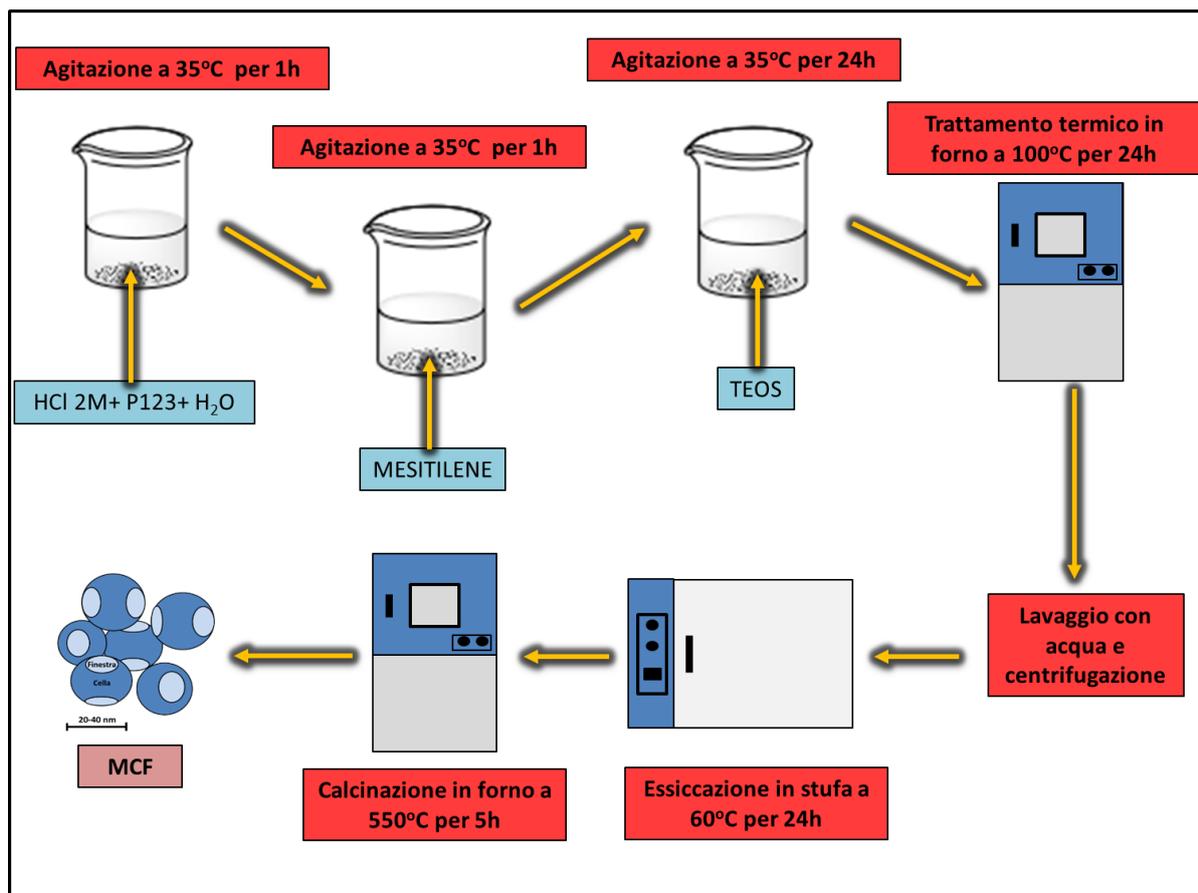


Figura 2.2: Struttura dei pori di MCF.



**Schema 2.2:** Schema di sintesi di MCF.

## 2.2 Caratterizzazione dei supporti

Per analizzare le proprietà strutturali dei supporti silicei mesoporosi è stato necessario utilizzare più tecniche di analisi, poiché non ne esiste una specifica in grado di fornire tutte le informazioni necessarie. Sono state utilizzate tre tecniche di analisi: fisisorbimento mediante  $\text{N}_2$  a 77 K, XRD (diffrazione raggi X) e microscopio elettronico a scansione ad alta risoluzione (FE-SEM). Le prime due tecniche sono state utilizzate solo per i supporti sintetizzati (SBA-15, MCF 0.5 e MCF 0.75), inoltre al FE-SEM invece sono stati analizzati anche i supporti commerciali e quelli sintetizzati con l'FDH immobilizzato sulla superficie, oltre a quelli senza enzima.

### 2.2.1 Analisi mediante fisisorbimento di $\text{N}_2$ a 77 K (analisi BET)

Questa tecnica è ampiamente utilizzata per la caratterizzazione di materiali porosi, da cui possono ricavare l'area specifica, il volume dei pori e la distribuzione dei pori. Per questo tipo di analisi è stato utilizzato lo strumento Micromeritics TriStar II 3020 (Figura 2.3). [1,4,7,11,12]



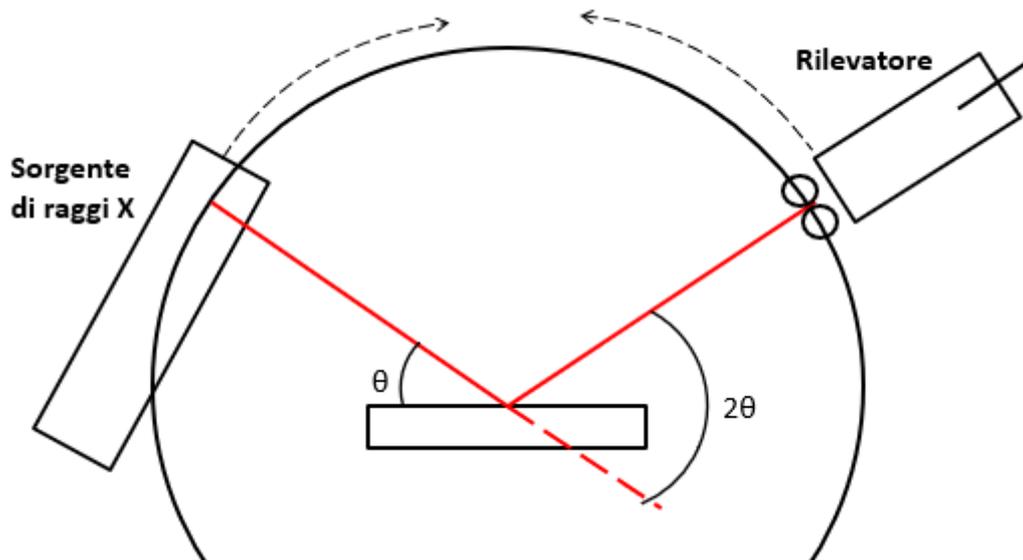
**Figura 2.3:** Strumento Micromeritics TriStar II 3020.

Le analisi vengono eseguite su campioni di circa 60 mg, questi sono introdotti dentro delle burette e subiscono, prima dell'analisi, un processo di degasaggio condotto a 200 °C per 2 h per rimuovere acqua e altri contaminanti atmosferici [1,4,7]. Il processo consiste in cicli di adsorbimento/desorbimento di N<sub>2</sub> a 77 K, in questo modo si ricava l'isoterma di adsorbimento e da questa, secondo il metodo BET (*Brunauer-Emmet-Teller*), l'area superficiale specifica ( $S_{BET}$ ) [1,4,7,12]. Invece, la distribuzione della grandezza dei pori è calcolata tramite il metodo BJH (*Barrett-Joyner-Halenda*) che si basa sul fenomeno della condensazione capillare in pori cilindrici. La porosità del materiale è calcolata dividendo il volume totale dei pori per il volume del materiale. Il volume totale dei pori ( $V_P$ ) si trova in corrispondenza del valore di pressione relativa  $P/P_0 = 0.99$  ed è pari al volume di liquido adsorbito [11,13].

### 2.2.2 Analisi XRD

La tecnica di analisi XRD (diffrazione raggi X) è usata per studiare strutture ordinate periodicamente a livello atomico. La lunghezza d'onda dei raggi X, emessi con un certo angolo di incidenza  $\theta$ , è dello stesso ordine di grandezza della distanza tra i piani cristallini, quindi i raggi vengono diffratti in base alla struttura del materiale (Figura 2.4). L'intensità del segnale diffratto cambia al variare dell'angolo di incidenza ( $\theta$ ) e presenta dei picchi correlati

alla disposizione e alla distanza dei piani atomici [14]. Solitamente per materiali aventi una struttura cristallina ordinata si usano angoli di diffrazione ( $2\theta$ ) compresi tra  $20^\circ$  e  $80^\circ$ , invece per materiali mesoporosi con pori ordinati periodicamente, come le silici mesoporose, si utilizzano bassi valori di  $2\theta$  ( $2\theta < 3^\circ$ ) [4,7]. Il diffrattometro Philips PW 3040/00 X'pert MPD è stato utilizzato per le analisi, utilizzando una radiazione Cu  $K\alpha$  e valori di  $2\theta$  inferiori a  $2^\circ$  [4,7].



**Figura 2.4:** Schema di funzionamento del diffrattometro.

### 2.2.3 FE-SEM

Per avere una più accurata informazione riguardo la morfologia dei supporti precedentemente citati, si è utilizzato un microscopio elettronico a scansione ad alta risoluzione (FE-SEM). Lo strumento utilizzato è il SUPRA™ 40 (ZEISS) equipaggiato di una colonna GEMINI (Figura 2.5). Il sistema genera un fascio di elettroni ad alta energia nel vuoto attraverso una colonna ad emissione di campo e in seguito questi sono accelerati in un campo magnetico ad alto gradiente. Questi elettroni emessi vengono poi deflessi da un sistema di lenti per produrre un fascio molto concentrato che poi andrà ad investire il campione da analizzare. In seguito a questo bombardamento di elettroni, dal campione si generano degli elettroni secondari. Dall'angolo e dalla velocità di questi elettroni secondari captati da un rivelatore, si ricavano informazioni sulla morfologia del campione. Sui campioni è stato applicato uno strato di platino di spessore inferiore ai 5 nm per renderli conduttivi e permettere agli elettroni emessi di diffondersi sui campioni. [15,16]



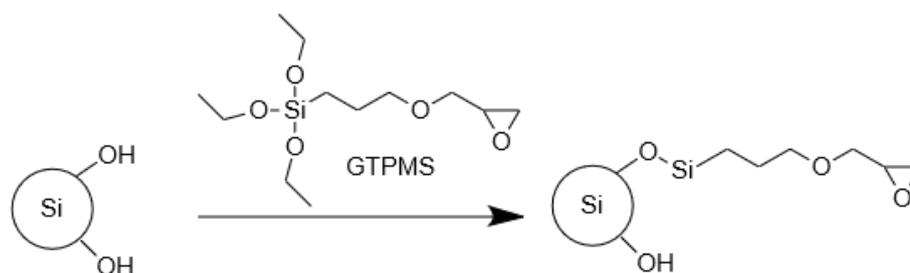
**Figura 2.5:** Microscopio elettronico a scansione SUPRA™ 40 (ZEISS).

### *2.3 Funzionalizzazione di silice mesoporosa con gruppi aldeidici*

L'aggiunta di gruppi aldeidici sulla superficie della silice mesoporosa (MSU-F, MSU-H, SBA-15, MCF 0.5 e MCF 0.75) ha come obiettivo quello di permettere all'enzima di immobilizzarsi su di esso tramite legami covalenti. Questo tipo di funzionalizzazione avviene grazie a tre reazioni: la prima serve ad aggiungere dei gruppi epossidici sulla superficie del supporto, la seconda serve a trasformare i gruppi epossidici in gruppi diolo, la terza serve a generare i gruppi aldeidici dai gruppi diolo; infine avviene la caratterizzazione del supporto funzionalizzato. (Schema 2.3)

#### 2.3.1 Funzionalizzazione con gruppi epossidici

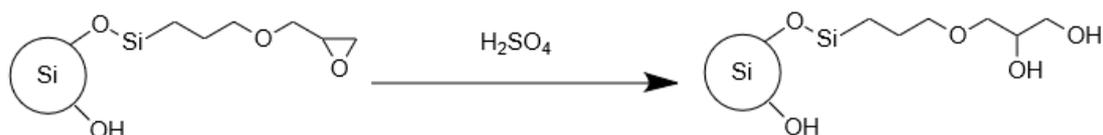
Si prepara, sotto cappa chimica, un bagno d'olio a 105 °C sopra il quale si pone un pallone contenente la silice, il toluene e il GPTMS (3-glicidilossipropiltrirossilano). Il bagno d'olio è mantenuto alla temperatura desiderata tramite una piastra riscaldante, inoltre si deve utilizzare una colonna di raffreddamento, posta sopra il pallone, per recuperare il toluene evaporato. La soluzione è composta dall' 1% in volume di GPTMS e dal restante 99% di toluene, la quantità di toluene si ricava dalla quantità di silice che si vuole funzionalizzare e per ogni grammo di silice bisogna aggiungere 30 ml di toluene. In questo modo si introducono dei gruppi epossidici, presenti nel GPTMS, sulla superficie della silice tramite la condensazione di gruppi silanolo (-Si-OH) del supporto, con gruppi alcossi (-OR') del GPTMS (Figura 2.6) [17,18]. Infine, si filtra la soluzione con un filtro di carta e si risciacqua prima con acetone e poi con acqua.



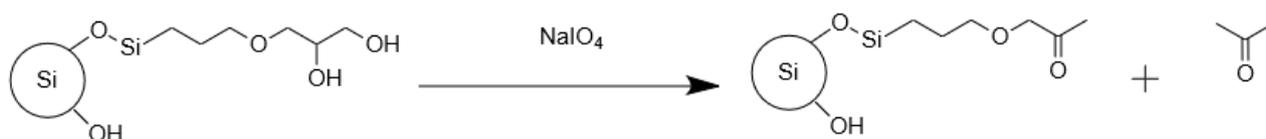
**Figura 2.6:** Reazione tra particella di silice e GTPMS.

### 2.3.2 Generazione dei gruppi diolo e aldeidici

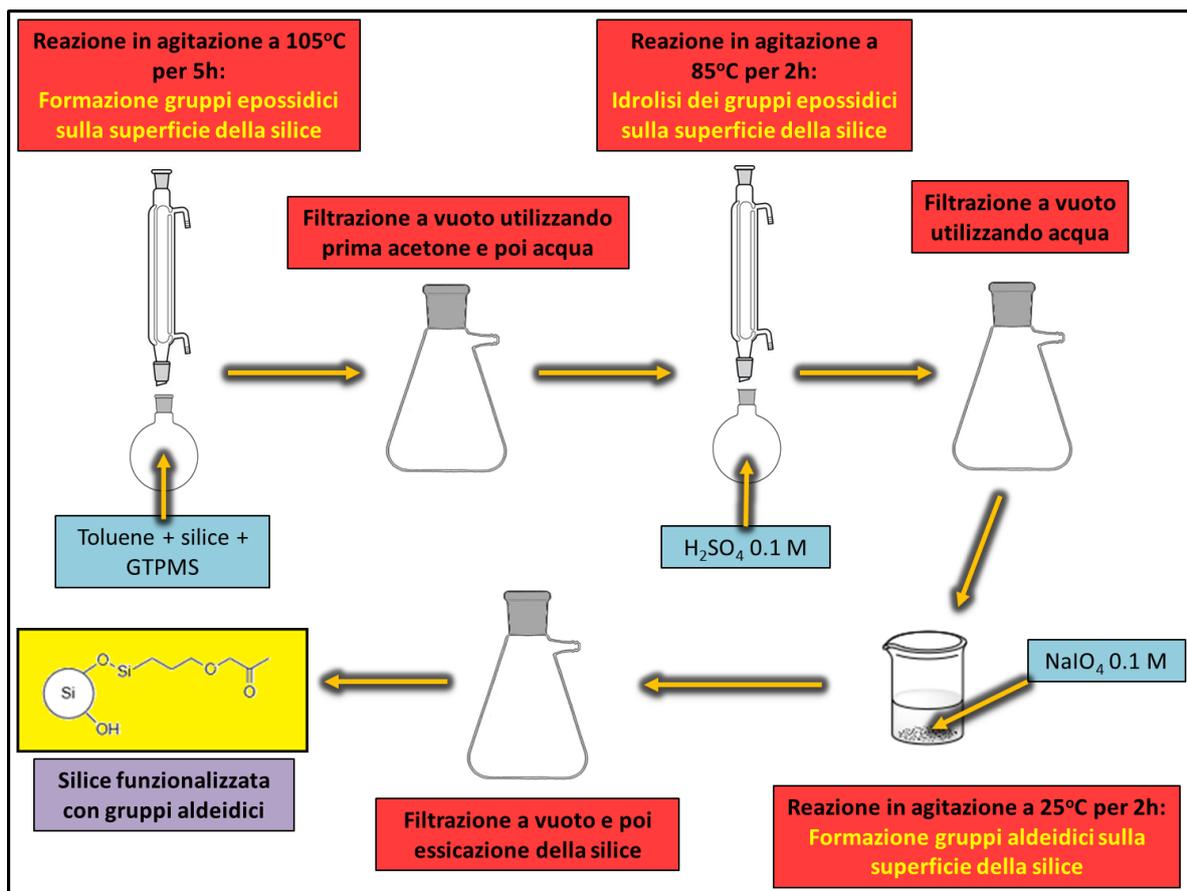
Per prima cosa avviene l'idrolisi di gruppi epossidici (Figura 2.7) con la soluzione di acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0.1 M per 2h a  $85^\circ\text{C}$ , usando lo stesso rapporto volume : massa di silice (30 ml/g) usato con il toluene. Dopo aver filtrato e lavato con acqua il supporto, si prepara una soluzione di periodato di sodio ( $\text{NaIO}_4$ ) 0.1 M (tenendo lo stesso rapporto 30 ml/g) Quindi si fa reagire la silice con  $\text{NaIO}_4$  a temperatura ambiente per 2h, questo permette l'ossidazione dei gruppi diolo (Figura 2.8) a gruppi aldeidici. Si prelevano 0.5 ml del surnatante all'inizio e al termine della reazione che verranno utilizzati per determinare la quantità di reagente che è reagita e così determinare la quantità di gruppi aldeidici formati sulla superficie del supporto. Infine, si filtra la soluzione e si lava utilizzando molta acqua per estrarre gli ioni periodato rimanenti. [17,18]



**Figura 2.7:** Reazione di idrolisi in ambiente acido.



**Figura 2.8:** Reazione di ossidazione dei gruppi diolo e formazione dei gruppi aldeidici.



**Schema 2.3:** Schema della funzionalizzazione della silice.

### 2.3.3 Caratterizzazione dei gruppi aldeidici formati

Per conoscere la quantità di gruppi aldeidici presenti sulla superficie del supporto siliceo, è necessario aggiungere ioduro di potassio (KI) al 10% in peso e una soluzione saturata di bicarbonato di sodio (NaHCO<sub>3</sub>), alle soluzioni contenenti ioni periodato all'inizio e al termine della reazione precedente. In questo modo, si forma un composto tra gli ioni periodato di sodio e lo ioduro di potassio, che ha il suo picco di assorbanza a 405 nm. Quindi, misurando l'assorbanza con uno spettrofotometro, della soluzione prima e dopo la reazione di ossidazione epossidica con il NaIO<sub>4</sub> [17,18] si può ricavare la quantità di gruppi aldeidici aggiunti sulla superficie del supporto tramite l'equazione (2.1).

$$X = (V_{IO_4^-} * \frac{[IO_4^-]_i - \frac{[IO_4^-]_f * A_f}{A_i}}{g_s}) * 10^6 \quad (2.1)$$

$X$  =  $\mu$ mol aldeidi / g supporto

$V_{IO_4^-}$  = volume soluzione periodato utilizzata (ml)

$[IO_4^-]_i$  = concentrazione ioni periodato nella soluzione iniziale (mol/L)

$A_f$  = assorbanza soluzione dopo la reazione

$A_i$  = assorbanza soluzione prima della reazione

$g_s$  = quantità di supporto utilizzata (g)

## 2.4 Immobilizzazione enzimatica di FDH (formiato deidrogenasi) su supporti silicei mesoporosi

L'immobilizzazione enzimatica avviene in due fasi: nella prima si utilizza una soluzione basica di tampone bicarbonato per legare l'enzima al supporto tramite un legame di Schiff (Figura 2.9); nella seconda invece, utilizzando boroidruro di sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), si riduce il legame di Schiff che diventa un legame covalente (Figura 2.10). La misura della quantità e dell'attività degli enzimi immobilizzati sul supporto avviene tra la prima e la seconda fase, prima di aggiungere il boroidruro. [12,17-19] (Schema 2.4)

La prima reazione tra enzima e supporto avviene utilizzando il tampone bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.1 M) per 60 minuti a 4 °C, il pH a 10.05 è fondamentale poiché al di sotto di 10 la reazione non avviene. La soluzione per la reazione è formata dal 75% di tampone e dal 15% di glicerolo che agisce come agente protettivo per l'enzima [17]. La quantità di soluzione da preparare si ricava dalla quantità di supporto a disposizione utilizzando il rapporto 20 ml di soluzione per grammo di silice. La quantità di enzima introdotto varia da 1 mg a 10 mg per grammo di supporto. A questo punto si preleva una piccola parte della soluzione che servirà come riferimento per la misura di attività, si aggiunge il supporto a quella rimanente e da questo momento parte la reazione. In seguito, si procede con la seconda reazione tra enzima immobilizzato e boroidruro di sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), con una concentrazione di 0.5 mg/ml. Si fa reagire sotto cappa chimica per 10 minuti a 4 °C, in seguito si filtra a vuoto la soluzione utilizzando una soluzione tampone fosfato 0.1 M pH = 7.5 e si conserva il prodotto in un essiccatore in frigo [12,17,18].

Per valutare la quantità di proteine immobilizzate sul supporto si utilizza il metodo di Bradford [20], tramite il quale si ricava la concentrazione delle proteine in soluzione (mg/ml). Questa si misura tramite l'assorbanza a 595 nm di un composto chimico formato dalla proteina e dal colorante Coomassie Brilliant Blue utilizzando la retta di taratura (2.2). Per la misura di assorbanza analizzata con lo spettrofotometro si utilizza una soluzione formata da: da 1 ml di reagente di Bradford (colorante) e da 100  $\mu\text{l}$  di soluzione proteica. Si analizzano due soluzioni proteiche, una prelevata prima di aggiungere il supporto e l'altra alla fine della reazione, in questo modo si trovano rispettivamente la concentrazione di proteina offerta a inizio reazione ( $P_0$ ) e la concentrazione di proteina a fine reazione presente nel surnatante ( $P_L$ ). La resa di immobilizzazione è definita in termini di proteina ( $IY_P$ ), secondo l'equazione (2.3) e il valore di proteina immobilizzata ( $P_I$ ) è:  $P_0 - P_L$ . (21,22)

$$A = 3.55 * C + 0.0459 \quad (2.2)$$

$A$  = assorbanza

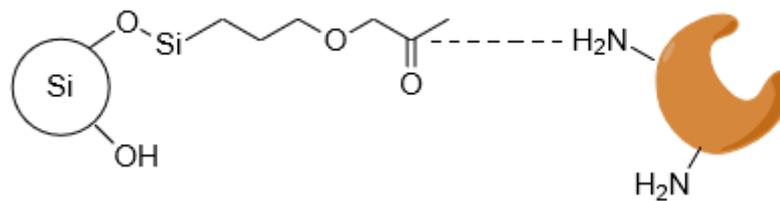
$C$  = concentrazione proteine (mg/ml)

$$IY_p = \frac{P_o - P_L}{P_o} * 100 \quad (2.3)$$

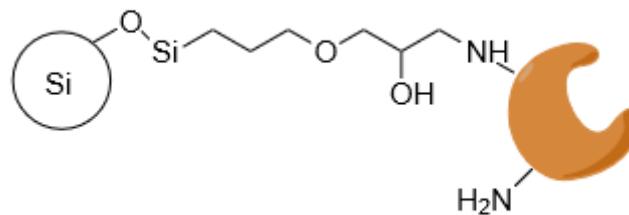
$IY_p$  = resa di immobilizzazione in termini di proteina

$P_o$  = proteina offerta a inizio reazione (mg/ml)

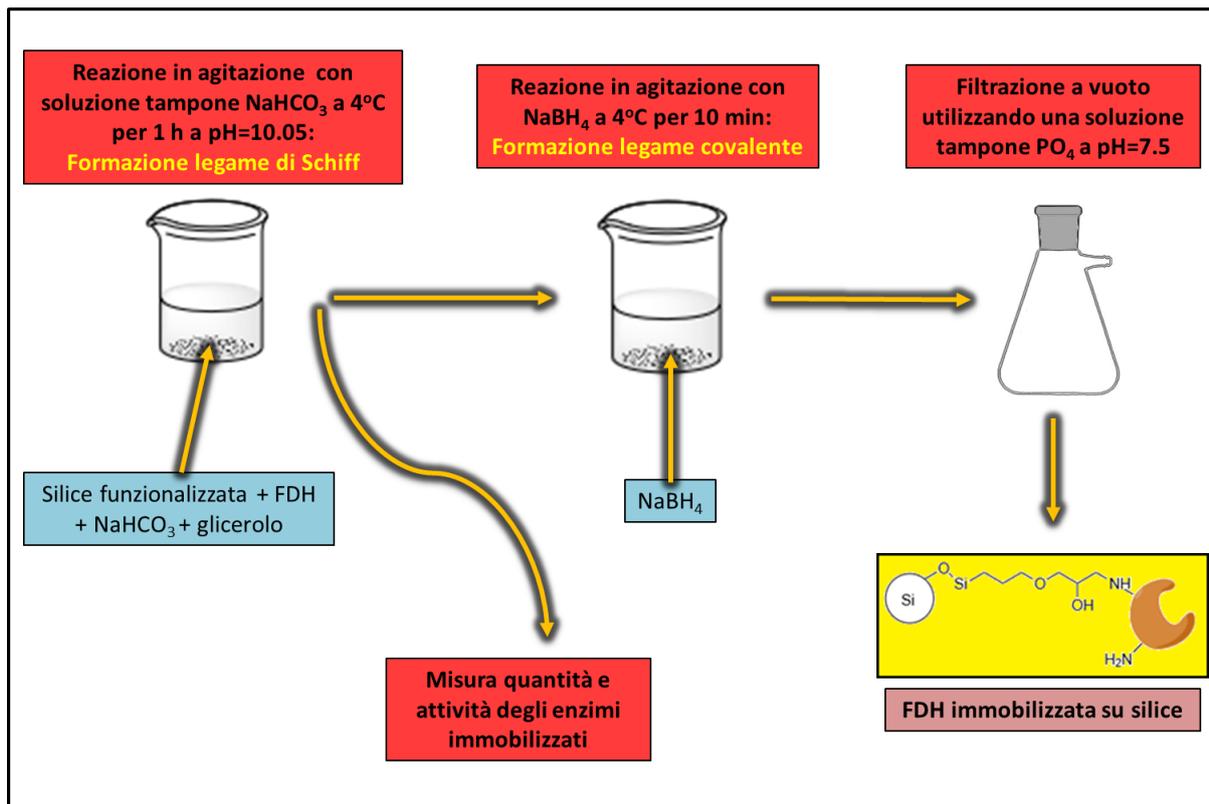
$P_L$  = proteina presente nel surnatante a fine reazione (mg/ml)



**Figura 2.9:** Formazione del legame di Schiff tra supporto ed enzima a pH 10.



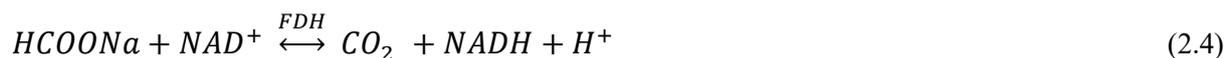
**Figura 2.10:** Riduzione del legame di Schiff tramite  $\text{NaBH}_4$  e formazione del legame covalente tra supporto ed enzima.



**Schema 2.4:** Schema dell'immobilizzazione enzimatica.

### 2.5 Misura dell'attività enzimatica di FDH (formiato deidrogenasi)

Per misurare l'attività enzimatica dell'FDH, libero e immobilizzato, si utilizza il metodo adoperato da *Barin R. e altri* [21,23,24]. Questo consiste nel rilevare l'assorbanza a 340 nm del NADH prodotto dalla reazione di ossidazione del formiato di sodio ( $\text{HCOONa}$ ), aggiungendo  $\text{NAD}^+$  come cofattore (equazione (2.4)). Per la misura di attività dell'enzima libero, si utilizza una soluzione composta da: 1 ml di tampone fosfato 0.1 M ( $\text{pH}$  7.5), 0.4 ml di formiato di sodio 300 mM, 50  $\mu\text{l}$  di  $\text{NAD}^+$  50 mM e 50  $\mu\text{l}$  di soluzione enzimatica diluita. La concentrazione di NADH si rileva utilizzando uno spettrofotometro e un coefficiente di assorbimento molare pari a  $\epsilon = 4.78 \text{ M}^{-1}$ . L'attività, quindi, si determina misurando l'incremento di assorbanza del NADH prodotto dalla reazione rispetto a un bianco, che ha assorbanza 0 a 340 nm. Per trovare la concentrazione di NADH prodotto dall'enzima immobilizzato si utilizza una soluzione avente gli stessi rapporti di concentrazione di quella impiegata per l'enzima libero. Tuttavia, è necessario centrifugare la soluzione per separarla dalla silice, per evitare il fenomeno di scattering dovuto a quest'ultima. Così facendo però, non è possibile avere direttamente il valore di incremento di assorbanza del NADH, ma è necessario ricavarlo da una retta costruita per punti trovata a diversi tempi di reazione (1,2 e 3 min).



L'attività dell'FDH si definisce in UI (Unità Internazionale di attività enzimatica) che rappresenta le  $\mu\text{mol}$  di NADH prodotte per minuto e per mg di enzima ( $UI_{\text{mg}}$ ) o per g di supporto ( $UI_{\text{g}}$ ) come descritto nella formula (2.5) [25]. L'attività relativa ( $A_{\text{REL}}$ ), dell'enzima immobilizzato, si calcola tramite la formula (2.6), definita come il rapporto tra l'attività dell'enzima immobilizzato ( $UI_{\text{IMM}}$ ) e l'attività dell'enzima solubile ( $UI_{\text{L}}$ ) riferite ai mg di enzima [26].

$$UI = \frac{\Delta A}{\Delta t} * \frac{1}{\varepsilon} * \frac{V_r}{c} \quad (2.5)$$

$UI$  = Attività ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) o ( $\mu\text{mol}/\text{min g}$ )

$c$  = (mg) enzima o (g) supporto

$V_r$  = volume soluzione analizzata allo spettrofotometro (ml)

$\frac{\Delta A}{\Delta t}$  = incremento di assorbanza del NADH

$\varepsilon$  = coefficiente di assorbimento molare ( $\text{M}^{-1}$ )

$$A_{\text{REL}} = \frac{UI_{\text{IMM}}}{UI_{\text{L}}} * 100 \quad (2.6)$$

$A_{\text{REL}}$  = attività relativa

$UI_{\text{IMM}}$  = attività enzima immobilizzato ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ )

$UI_{\text{L}}$  = attività enzima libero ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ )

## 2.6 Stabilità termica

Per valutare la stabilità termica dell'enzima solubile e immobilizzato, questi vengono incubati a  $50^\circ\text{C}$  per 24 h in una eppendorf contenente la soluzione tampone fosfato 0.1 M (pH 7.5). Si utilizza una diluizione di 1:100 per l'enzima solubile e una concentrazione di circa 100 mg/ml di enzima immobilizzato. L'attività si misura con il metodo descritto nel paragrafo precedente (Paragrafo 2.5) riferita ai mg di enzima ( $UI_{\text{mg}}$ ). La stabilità termica quindi, si valuta in termini percentuali di attività residua ( $A_{\text{RES}}$ ), cioè il rapporto tra l'attività di un campione prelevato a un tempo definito ( $A_{\text{N}}$ ) e l'attività iniziale prima dell'incubazione e quindi prima dell'inattivazione ( $A_0$ ) tramite l'equazione (2.7). [12,17]

$$A_{RES} = \frac{A_N}{A_0} * 100 \quad (2.7)$$

$A_{RES}$  = attività residua (%)

$A_N$  = attività campione ad un tempo definito ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ )

$A_0$  = attività iniziale ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ )

È stato utilizzato, sia per l'FDH solubile che immobilizzato, un modello del primo ordine a uno stadio per descrivere la disattivazione termica enzimatica, proposto da *Henley J. e Sadana A.* [28]. Il modello descrive l'disattivazione tramite una netta transizione dell'enzima da una forma "nativa" attiva ( $E_{NAT}$ ) a una forma completamente inattiva ( $E_{IN}$ ). Questa transizione può essere descritta dall'ipotetica reazione chimica:



$E_{NAT}$  = forma attiva dell'enzima

$E_{IN}$  = forma inattiva dell'enzima

$k_D$  = costante cinetica della velocità di disattivazione termica ( $\text{h}^{-1}$ )

Questo meccanismo porta un modello del primo ordine che può essere descritto dall'equazione:

$$-\frac{dA}{dt} = k_D * A \quad (2.9)$$

Il modello, tramite integrazione, porta a un profilo esponenziale dell'attività enzimatica rispetto al tempo:

$$\ln \frac{A}{A_0} = -k_D * t \quad (2.10)$$

$$\frac{A}{A_0} = \exp(-k_D * t) \quad (2.11)$$

$A$  = attività enzimatica ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ )

$A_0$  = attività enzimatica iniziale ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ )

$k_D$  = costante cinetica della velocità di disattivazione termica ( $\text{h}^{-1}$ )

$t$  = tempo ( $\text{h}^{-1}$ )

Dall'equazione (2.10) si ricava una correlazione lineare tra l'attività residua ( $A/A_0$ ) e il tempo ( $t$ ) in un grafico semilogaritmico. Da questo si può ricavare la costante di disattivazione termica  $k_D$  che risulta essere l'unico parametro necessario per correlare i dati sperimentali con il modello [29]. È stato definito anche il tempo di dimezzamento ( $t_{1/2}$ , come il tempo di incubazione necessario per far perdere all'enzima metà della sua attività iniziale (2.12). Per quantificare la migliore stabilità termica ottenuta tramite l'immobilizzazione è stata definita il fattore di stabilità termica (SF) come il rapporto tra il tempo di dimezzamento dell'enzima immobilizzato ( $t_{1/2}^I$ ) e il tempo di dimezzamento dell'enzima solubile ( $t_{1/2}^S$ ) (2.13). [12]

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_D} \quad (2.12)$$

$$SF = \frac{t_{1/2}^I}{t_{1/2}^S} \quad (2.13)$$

$t_{1/2}$  = tempo di dimezzamento dell'enzima ( $h^{-1}$ )

$k_D$  = costante cinetica della velocità di disattivazione termica ( $h^{-1}$ )

SF = fattore di stabilità termica

$t_{1/2}^I$  = tempo di dimezzamento dell'enzima immobilizzato ( $h^{-1}$ )

$t_{1/2}^S$  = tempo di dimezzamento dell'enzima solubile ( $h^{-1}$ )

## 2.7 Reazione tra $CO_2$ e FDH (formiato deidrogenasi)

La reazione tra l'anidride carbonica ( $CO_2$ ) e l'FDH è l'inversa della reazione sfruttata per la misura dell'attività enzimatica (2.14), con la produzione di acido formico ( $HCOOH$ ) [27].



Si utilizza una bottiglia di coltura da 160 ml dove si inseriscono 30 ml di soluzione tampone fosfato e si disciolgono 212 mg di NADH in modo da avere una concentrazione di 10 mM. Si conducono prove con soluzioni tampone 0.2 M a pH = 8 e a pH = 7. Successivamente, si procede in maniera differente per l'enzima solubile (Schema 2.5) e quello immobilizzato (Schema 2.6). Si effettuano delle prove con  $CO_2$  flussata in continuo e in discontinuo (batch). Tutte le prove sono state svolte a pressione atmosferica.

Per l'FDH in soluzione, dopo aver aggiunto il NADH e tappato ermeticamente la bottiglia, si fa gorgogliare da un ago la  $CO_2$  all'interno della soluzione a 40 ml/min per circa 40 minuti. Per le prove con  $CO_2$  flussata in continuo, si fa gorgogliare il gas per tutta la durata della prova a 15 ml/min. In seguito, si prelevano 1.5 ml di soluzione, con una siringa, che

serviranno da riferimento per la misura di attività e quindi del consumo di NADH. A questo punto, si fa partire la reazione aggiungendo 7.5 mg di FDH, e si mantiene in agitazione a 25 °C. Si prelevano dei campioni, durante la reazione, di circa 2 ml di soluzione e si misura l'assorbanza del NADH a 340 nm presente nei campioni prelevati, con una diluizione 1:100, come descritto nel *Paragrafo 2.5*. Questi campioni, conservati in delle eppendorf, vengono o messi a bagno per 5 minuti a 90 °C oppure viene aggiunta una soluzione 0.1 M di HCl in rapporto volumico 1/5, per disattivare l'enzima.

Per l'FDH immobilizzato, dopo aver aggiunto il NADH e misurato l'attività, si fa gorgogliare da un ago la CO<sub>2</sub> per 40 minuti a 40 ml/min, successivamente si aggiungono circa 250 mg di silice con l'FDH immobilizzato e si tappa ermeticamente la bottiglia. Per le prove con CO<sub>2</sub> flussata in continuo, si continua a far gorgogliare da un ago il gas per tutta la durata della prova a 15 ml/min. In seguito, durante la reazione mantenuta in agitazione a 25 °C, si prelevano dei campioni di circa 2 ml di soluzione con una siringa. Dopo avere centrifugato i campioni, da questi si preleva il surnatante e si misura, come per l'enzima solubile, l'assorbanza del NADH. Sono state condotte anche delle prove successive con l'FDH immobilizzato per valutarne la riutilizzabilità. Il biocatalizzatore immobilizzato, dopo aver reagito come descritto in precedenza con la CO<sub>2</sub> ed essere stato centrifugato, viene recuperato utilizzando della soluzione tampone fosfato a pH 7.5 dalle eppendorf. Successivamente, la sospensione contenente l'FDH immobilizzato viene filtrata a vuoto con la soluzione tampone fosfato pH 7.5. In seguito, si misura l'attività dell'enzima immobilizzato tramite il procedimento descritto nel *Paragrafo 2.5* e dopo essere stato di nuovo filtrato può essere riutilizzato per una nuova reazione con la CO<sub>2</sub>.

La quantità di acido formico prodotta si determina tramite HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) della Shimadzu Prominence (Figura 2.11). La fase mobile è composta da H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM con un flusso di 0.6 ml/min, una corsa di 30 min e la temperatura fissata a 50 °C. Il picco di acido formico si vede tramite RID (*refractive index detector*) a 15 min, 50 µl vengono prelevati per le analisi. È stata utilizzata la retta di taratura (2.15) per ricavare le concentrazioni dell'acido formico in ppm, cioè in mg/kg che però possono essere considerati mg/L in una soluzione acquosa.

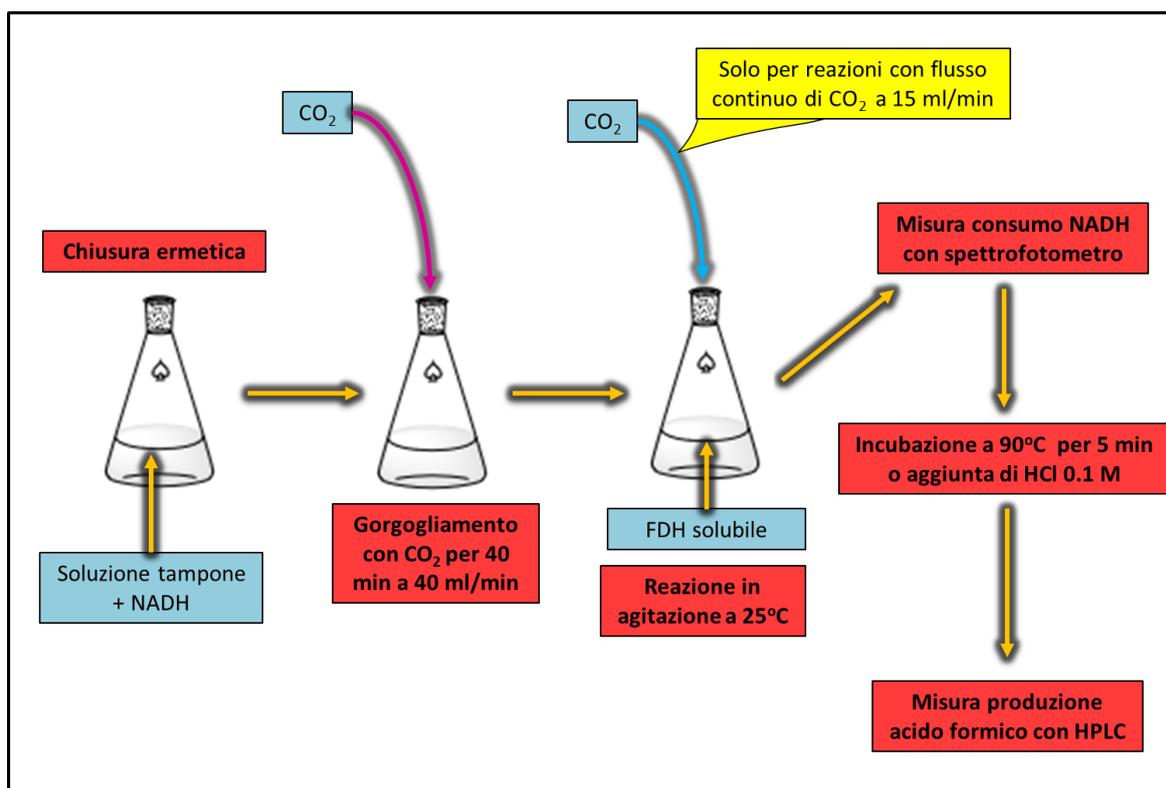
$$Area = 195.96 * C_{ppm} \quad (2.15)$$

*Area* = area ricavata dall'HPLC

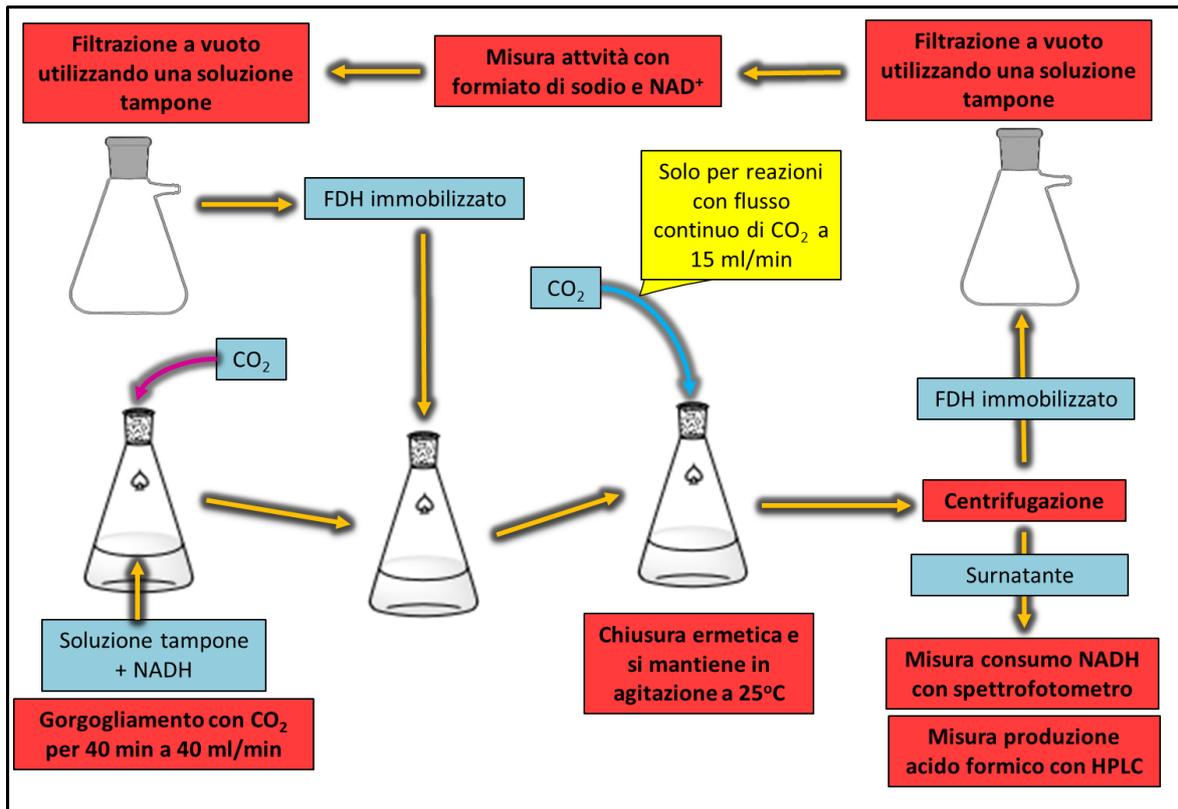
*C<sub>ppm</sub>* = concentrazione acido formico in ppm (mg/L)



Figura 2.11: HPLC della Shimadzu Prominence.



Schema 2.5: Procedimento utilizzato per la reazione tra CO<sub>2</sub> e FDH solubile.



**Schema 2.6:** Procedimento utilizzato per la reazione tra CO<sub>2</sub> e FDH immobilizzato.

## Bibliografia

- [1]. Johansson E. M. *Controlling the Pore Size and Morphology of Mesoporous Silica*. Department of Physics, Chemistry and Biology (IFM), Linköping University. 2010.
- [2]. Johansson E. M., Ballem M. A., Córdoba J. M., Magnus O. Rapid Synthesis of SBA-15 Rods with Variable Lengths, Widths, and Tunable Large Pores. *Langmuir* 27. 2011, 4994-4999.
- [3]. Hussain M., Fino D., Russo N. N<sub>2</sub>O decomposition by mesoporous silica supported Rh catalysts. *Journal of Hazardous Materials* 211-212. 2012, 255-265.
- [4]. Hussain M., Fino D., Russo N. Modified KIT-6 and SBA-15-spherical supported metal catalysts for N<sub>2</sub>O decomposition. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1. 2013, 164-174.
- [5]. Park J. G., Ko C. H., Yi K. B., Park J., Han S., Cho S., Kim S. Reactive adsorption of sulfur compounds in diesel on nickel supported on mesoporous silica. *Applied Catalysis B: Environmental* 81. 2008, 244-250.
- [6]. Rubaya R., Farhana A., Saika A., Muhammed S. M., Abu Bin H. S. Control of the Porosity and Morphology of Ordered Mesoporous Silica by Varying Calcination Conditions. *Materials Today: Proceedings* 15. 2019, 546-554 .
- [7]. Piumetti M., Bonelli B., Massiani P., Dzwigaj S., Rossetti I., Casale S., Armandi M., Thomas C., Garronea E. Effect of vanadium dispersion and of support properties on the catalytic activity of V-containing silicas. *Catalysis Today* 179. 2012, 140-148.
- [8]. Liu Y., Feng w., Li T., He H., Dai W., Huang W., Cao Y., Fan K. Structure and catalytic properties of vanadium oxide supported on mesocellulose silica foams (MCF) for the oxidative dehydrogenation of propane to propylene. *Journal of Catalysis* 239. 2006, 125-136.
- [9]. Kim H., Jung J. C., Yeom S. H., Lee K., Yi J., Song I. K. Immobilization of a heteropolyacid catalyst on the aminopropyl-functionalized mesostructured cellular foam (MCF) silica. *Material research bulletin* 42. 2007, 2132–2142.
- [10]. Karkamkar A., Kim S. and J. Pinnavaia T. J. Hydrothermal Restructuring of the Cell and Window Sizes of Silica Foams. *Chemistry of Materials* 15. 2003, 11-13.
- [11]. Rouquerol J., Rouquerol F., Llewellyn P., Maurin G., Sing K. Chapter 13: Adsorption by Ordered Mesoporous Materials. *Adsorption by Powders and Porous Solids*. 2014. Elsevier. Marseille, Montpellier (Francia).
- [12]. Bernal C., Urrutia P., Illanes A., Wilson L. Hierarchical meso-macroporous silica grafted with glyoxyl groups: opportunities for covalent immobilization of enzymes. *New biotechnology* 30. 2013, 500-506.

- [13]. Hanzawa Y., Kaneko K. Carbon Alloys, Chapter 20 - Gas Adsorption. *Carbon Materials: Science and Engineering*. 2003. Tsinghua univeristy press (Cina).
- [14]. Speakman S. A. *Basics of X-Ray Powder Diffraction*. (Online) (Visualizzato il 2 Settembre 2019). 2011. <http://prism.mit.edu/xray/Basics%20of%20X-Ray%20Powder%20Diffraction.pdf>.
- [15]. Politecnico di Torino-DISAT. Carbon Group. *Field emission SEM* (Online) (Visualizzato il 5 Settembre 2019) [https://areeweb.polito.it/ricerca/carbongroup/fac\\_fesem.html](https://areeweb.polito.it/ricerca/carbongroup/fac_fesem.html).
- [16]. Nijmegen, Radboud University. *Information on the FESEM (Field-emission Scanning Electron Microscope)* (Online) (Visualizzato il 5 Settembre 2019) [https://www.vcbio.science.ru.nl/fesem\\_info\\_eng](https://www.vcbio.science.ru.nl/fesem_info_eng).
- [17]. Bernal C., Sierra L., Mesa M. Improvement of thermal stability of B-galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macro-mesoporous silica. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 84. 2012, 166–172.
- [18]. Bernal C., Guzman F., Illanes A., Wilson L. Selective and eco-friendly synthesis of lipoaminoacid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts. *Food Chemistry* 239. 2018, 189–195.
- [19]. Bolivar J. M., Wilson L., Ferrarotti S. A., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M., Mateo C. Stabilization of a Formate Dehydrogenase by Covalent Immobilization on Highly Activated Glyoxyl-Agarose Supports. *Biomacromolecules* 7, 2006, 673-669.
- [20]. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72. 1976, 248-254.
- [21]. Barin R., Biria D., Rashid-Nadimi S., Asadollahi M. A. Enzymatic CO<sub>2</sub> reduction to formate by formate dehydrogenase from *Candida boidinii* coupling with direct electrochemical regeneration of NADH. *Journal of CO<sub>2</sub> utilization* 28. 2018, 117-125.
- [22]. Illanes A., Lafuente F., Guisàn J. M., Wilson L. Chapter 4: Heterogeneous Enzyme Kinetics. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Valparaíso (Cile) : Springer, 2008.
- [23]. Amao Y., Ikeyama S. Discovery of the Reduced Form of Methylviologen Activating Formate Dehydrogenase in the Catalytic Conversion of Carbon Dioxide to Formic Acid. *Chemistry Letters* 44, 2015, 1182-1184
- [24]. Petkova G. A., Záruba K., Král V. Synthesis of silica particles and their application as supports for alcohol dehydrogenases and cofactor immobilizations: Conformational changes that lead to switch in enzyme stereoselectivity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824. 2012, 792-801.

- [25]. Illanes A. Chapter I: Introduction. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Valparàiso (Cile). Springer, 2008.
- [26]. Kim M. H., Park S., Kim Y. K., Won K., Lee S. H. Immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through cross-linked enzyme aggregates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 97. 2013, 209-214.
- [27]. Kim Y., Leeb S., Oh B. Enhancement of formic acid production from CO<sub>2</sub> in formate dehydrogenase reaction using nanoparticles. *RSC Advances* 6. 2016, 109978-109982.
- [28]. Henley J., Sadana A. Deactivation theory. *Biotechnology and Bioengineering* 28. 1986, 1277–1285
- [29]. Illanes A., Altamirano C., Wilson L. Chapter III: Homogeneous Enzyme Kinetics. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Valparàiso (Cile). Springer, 2008.

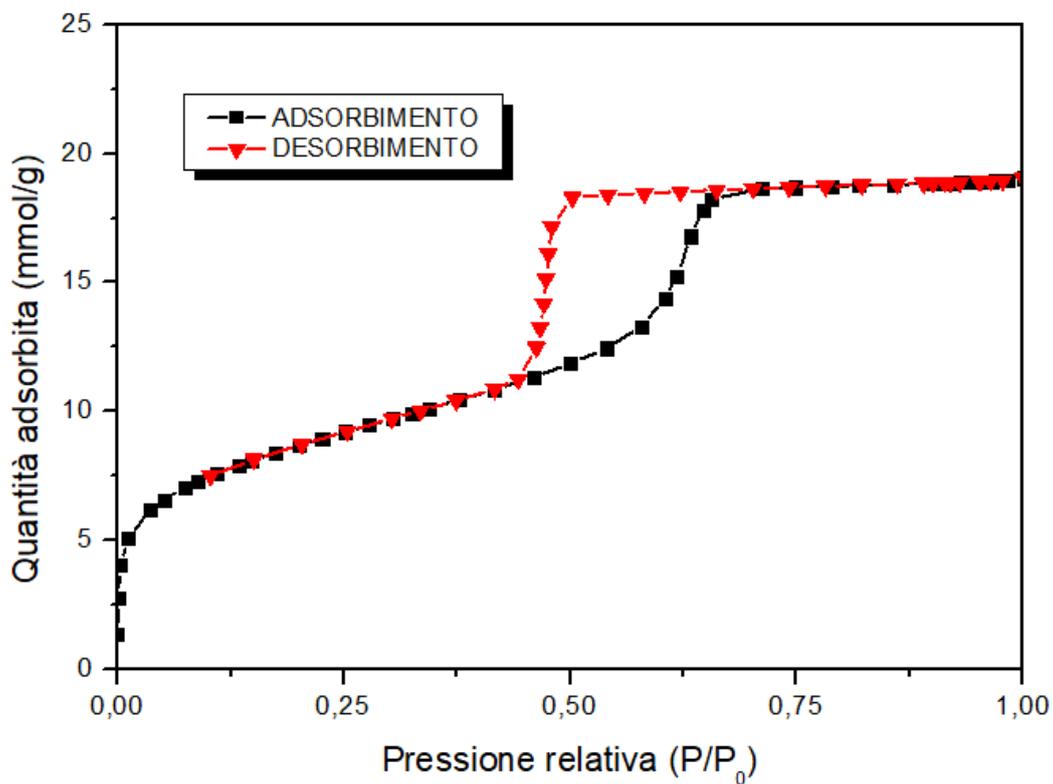


### 3. Risultati

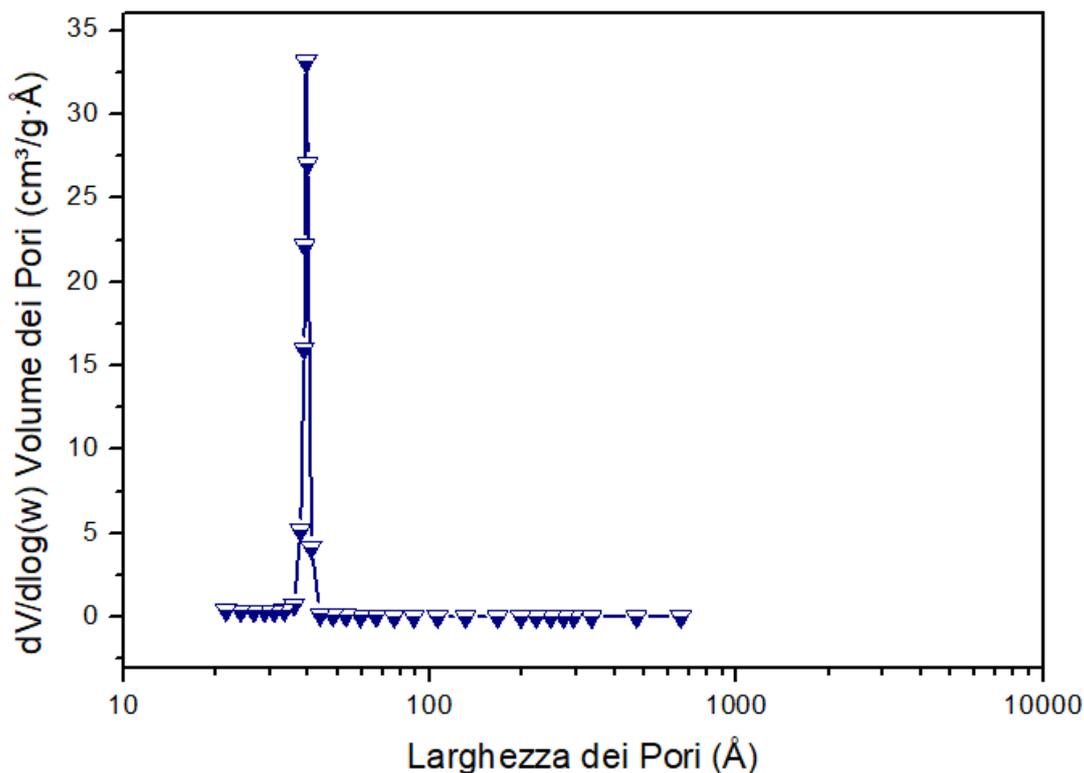
#### 3.1 Caratterizzazione dei supporti

##### 3.1.1 Analisi BET

Di seguito sono riportati i grafici delle curve di adsorbimento e desorbimento di  $N_2$  e anche la distribuzione della dimensione dei pori trovata tramite il metodo BJH. I campioni analizzati sono SBA-15, MCF 0.5 (rapporto Mesitilene/Pluronic 0.5) e MCF 0.75 (rapporto Mesitilene/Pluronic 0.75). Infine, si riportano i dati di  $S_{BET}$  (area superficiale specifica),  $V_P$  (volume totale dei pori),  $D_P$  (diametro medio dei pori), nella Tabella 3.1.



**Figura 3.1:** Isotherme di adsorbimento e desorbimento dell' $N_2$  di SBA-15 (analisi BET).



**Figura 3.2:** Distribuzione della dimensione dei pori di SBA-15 (metodo BJH).

Per il supporto siliceo SBA-15 si può notare che le isoterme di adsorbimento e desorbimento (Figura 3.1) sono di tipo IV e formano un ciclo di isteresi H2, tipico dei materiali mesoporosi aventi pori non uniformi [1-4]. A un'isteresi di questo tipo corrispondono dei pori aventi l'apertura più piccola rispetto alla grandezza degli stessi [3,5]. Dalla quantità di  $N_2$  adsorbita a  $P/P_0$  è possibile ricavare il valore di  $V_P$  (volume totale dei pori), invece dalla posizione del punto di flesso si ricavano informazioni sulla misura del  $D_P$  (diametro medio dei pori). Per quanto riguarda la distribuzione della grandezza dei pori di SBA-15 (Figura 3.2), si può notare un picco molto marcato al valore di circa 40 Å (più o meno 4 nm), da ciò si può supporre che i pori dell'SBA-15 siano praticamente tutti grandi uguali.

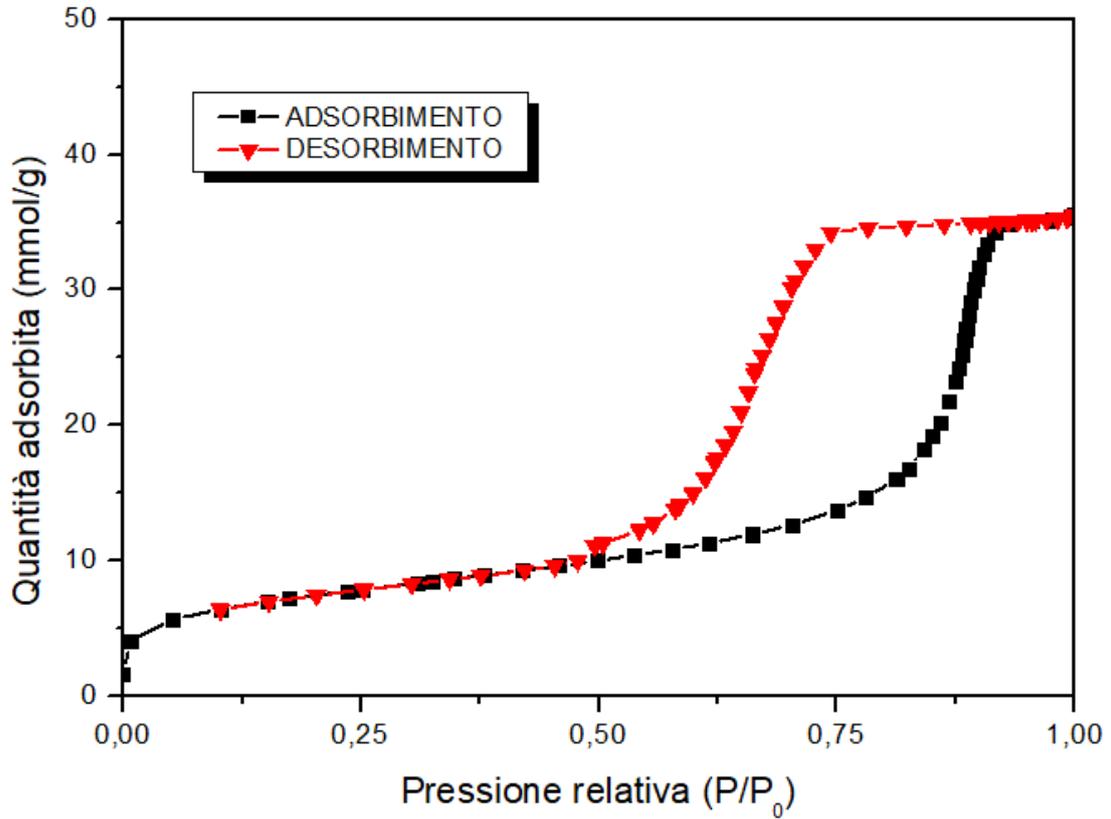


Figura 3.3: Isotherme di adsorbimento e desorbimento dell' $N_2$  di MCF 0.5 (analisi BET).

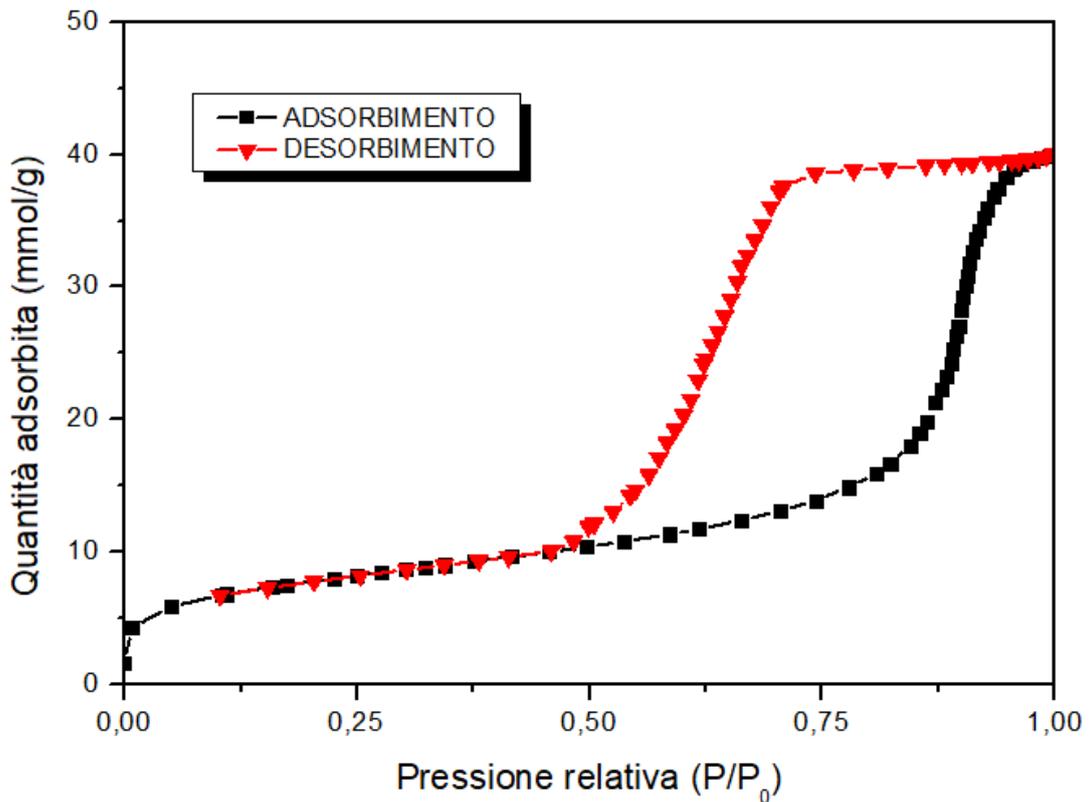


Figura 3.4: Isotherme di adsorbimento e desorbimento dell' $N_2$  di MCF 0.75 (analisi BET).

Si può vedere che per le isoterme di MCF 0.5 e MCF 0.75 i punti di flesso sono spostati verso valori più alti di  $P/P_0$  rispetto ai valori di SBA-15, questo informa sul fatto che i diametri medi dei pori ( $D_p$ ) dei supporti MCF 0.5 e MCF 0.75 siano maggiori rispetto a quelli di SBA-15 [1,6]. Dal confronto tra le isoterme di adsorbimento/desorbimento di MCF 0.5 e MCF 0.75 (Figura 3.3 e 3.4), si può supporre che per MCF 0.75 le proprietà strutturali ( $S_{BET}$ ,  $V_p$  e  $D_p$ ) siano migliori rispetto a MCF 0.5. Infatti, si può vedere che la quantità di  $N_2$  adsorbita a  $P/P_0 = 0.99$  è maggiore per MCF 0.75 rispetto a MCF 0.5 indicando quindi un  $V_p$  maggiore. Quindi si può stabilire che aumentando il rapporto M/P (Mesitilene/Pluronic) aumentano le proprietà strutturali di MCF [7]. I valori nella Tabella 3.1 confermano tali ipotesi. Tuttavia, i valori di  $D_p$  dei supporti MCF 0.5 e MCF 0.75 risultano inesatti se calcolati con il metodo BJH, questo viene confermato sia dall'analisi BET che dai valori trovati in letteratura. *Schmidt-Winkel P. e Piumetti M.* hanno sintetizzato con lo stesso procedimento utilizzato in questa tesi, MCF 0.5 e MCF 0.75 ed hanno calcolato il  $D_p$ , tramite il metodo Broekhoff de Boer usando l'approssimazione di Hill (BdB-FHH). Hanno trovato un  $D_p$  di circa 20 nm per MCF 0.5 e circa 25 nm per MCF 0.75 con finestre di dimensioni maggiori di 10 nm in entrambi i casi (Tabella 3.1). [8,23]

**Tabella 3.1.** Proprietà strutturali dei supporti.

<b>SUPPORTO</b>	<b><math>S_{BET}</math> (<math>m^2/g</math>)</b>	<b><math>V_p</math> (<math>cm^3/g</math>)</b>	<b><math>D_p</math> (nm)</b>
MSU-F	562	2.31	15 <sup>a</sup>
MSU-H	750	0.91	7 <sup>a</sup>
SBA-15	674	0.71	4 <sup>b</sup>
MCF 0.5	573	1.25	20 <sup>c</sup>
MCF 0.75	600	1.40	25 <sup>c</sup>

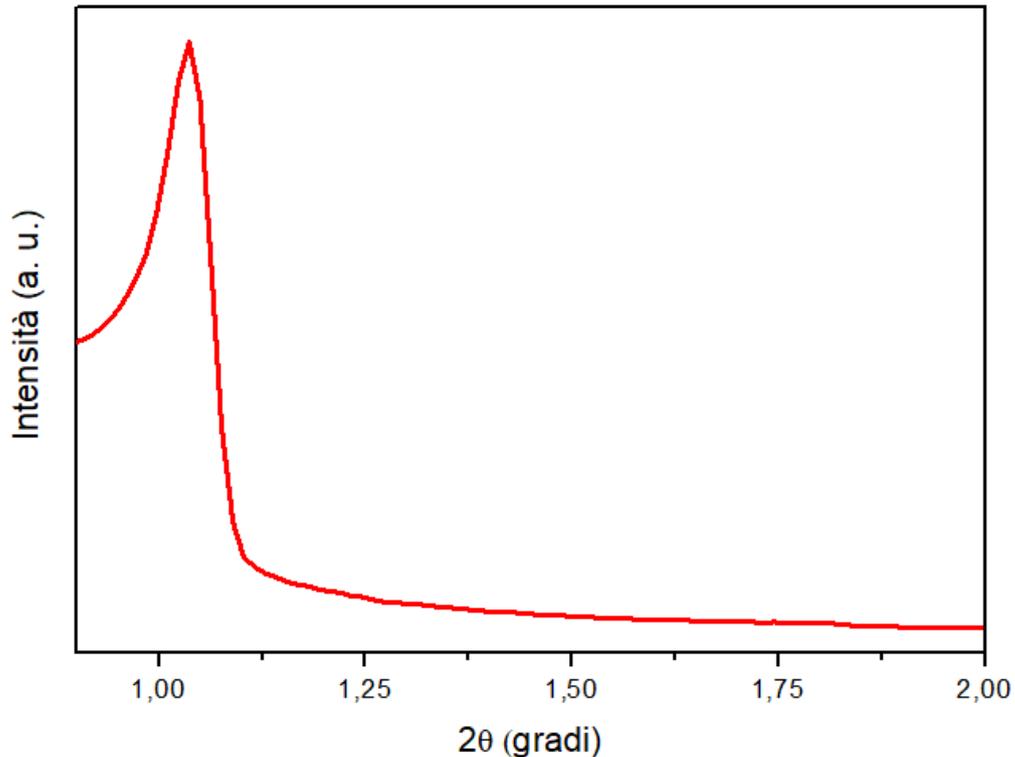
<sup>a</sup> Diametro medio dei pori dei supporti commerciali.

<sup>b</sup> Diametro medio dei pori calcolato con il metodo BJH.

<sup>c</sup> Diametro medio dei pori calcolato con il metodo BdB-FHH. Valori riportati da letteratura [8,23].

### 3.1.2 Analisi XRD

Di seguito sono riportati i grafici con gli spettri relativi all'analisi XRD dei materiali sintetizzati: SBA-15, MCF 0.5 (rapporto Mesitilene/Pluronic 0.5) e MCF 0.75 (rapporto Mesitilene/Pluronic 0.75).



**Figura 3.5:** Spettro XRD di SBA-15.

Si può notare per lo spettro di SBA-15 (Figura 3.5), che visibilmente c'è un solo picco di diffrazione a circa  $2\theta = 1^\circ$ . Questo picco (1 0 0) è tipico di questo materiale, come visto da *Piumetti M. e altri*, ed è dovuto alla simmetria esagonale dei pori  $p6mm$  [8,9]. Solitamente, come visto da *Hussein M. e altri*, SBA-15 presenta anche altri due picchi (1 1 0) e (2 0 0) a circa  $2\theta = 1,7^\circ$  e  $2\theta = 1,9^\circ$  dovuti alla sua simmetria esagonale [10]. In questo caso (Figura 3.5), non si notano gli altri due picchi, questo può essere dato dal fatto che il materiale sintetizzato è meno strutturalmente ordinato rispetto ai tradizionali SBA-15 sintetizzati.

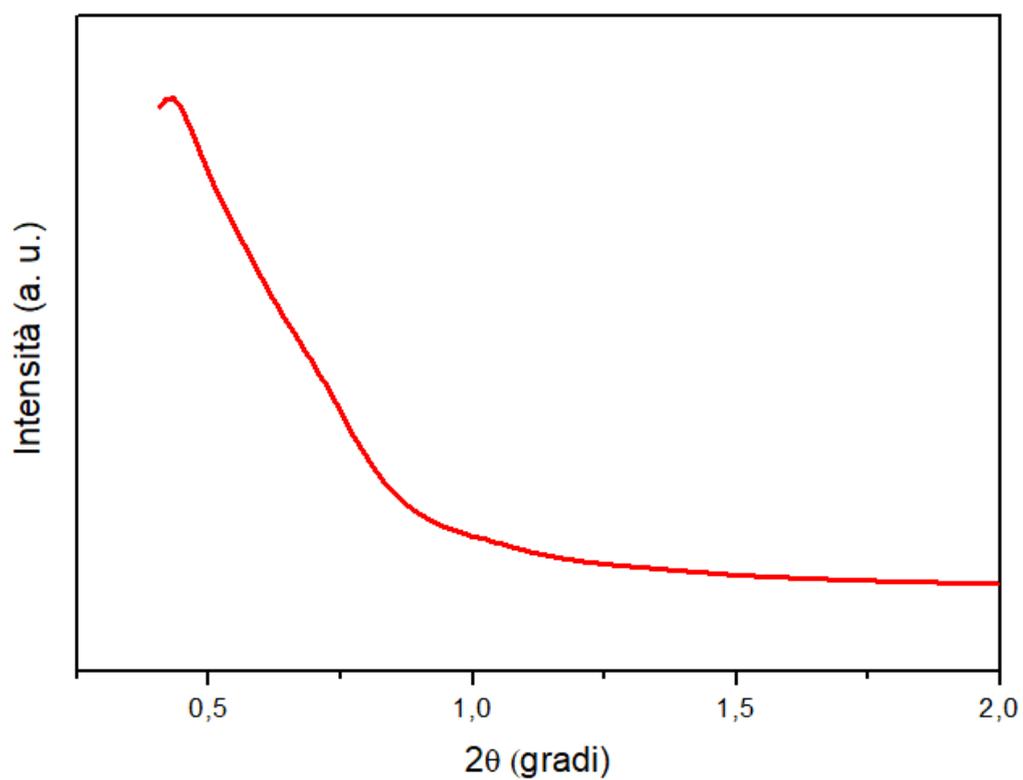


Figura 3.6: Spettro XRD di MCF 0.5.

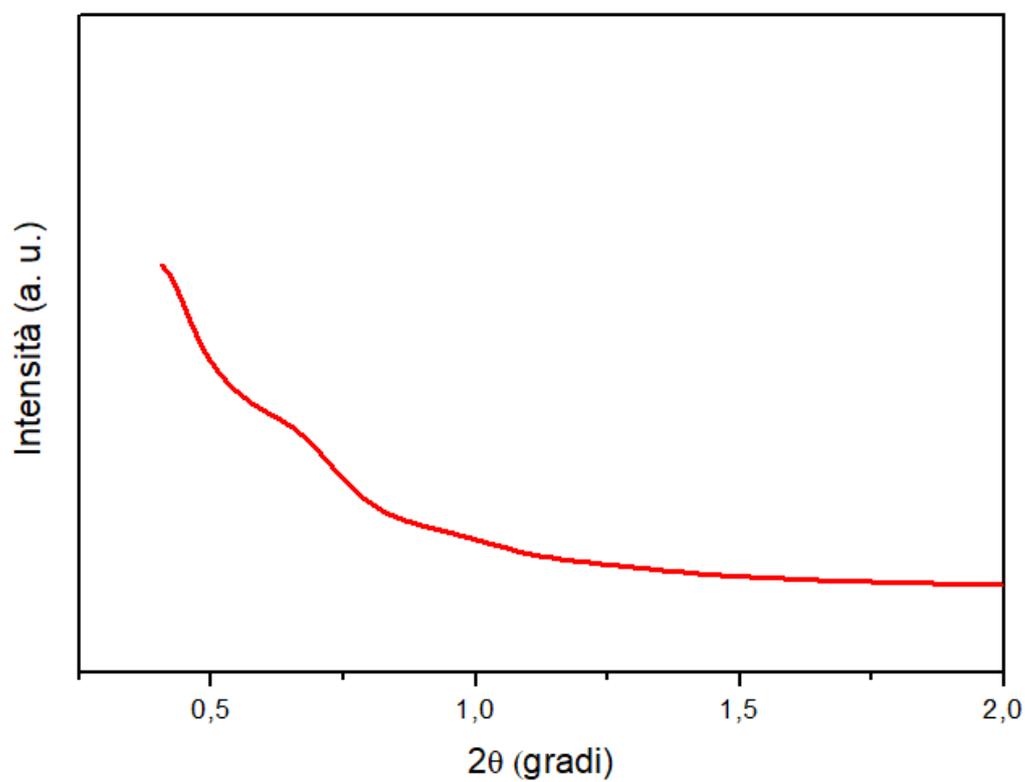


Figura 3.7: Spettro XRD di MCF 0.75.

Per quanto riguarda gli spettri di MCF 0.5 e MCF 0.75 (Figura 3.6 e Figura 3.7) non si notano picchi di diffrazione tra  $2\theta = 0.5^\circ$  e  $2\theta = 2^\circ$ . Questo dimostra che i due supporti non hanno una struttura simmetrica periodica dei pori al contrario di SBA-15 [7,11].

### 3.1.3 Analisi FE-SEM

Di seguito sono riportate le immagini FE-SEM dei supporti silicei mesoporosi sintetizzati SBA-15 (Figura 3.8), MCF 0.5 (Figura 3.9), MCF 0.75 (Figura 3.10) e dei supporti commerciali MSU-F (Figura 3.11) e MSU-H (Figura 3.12).

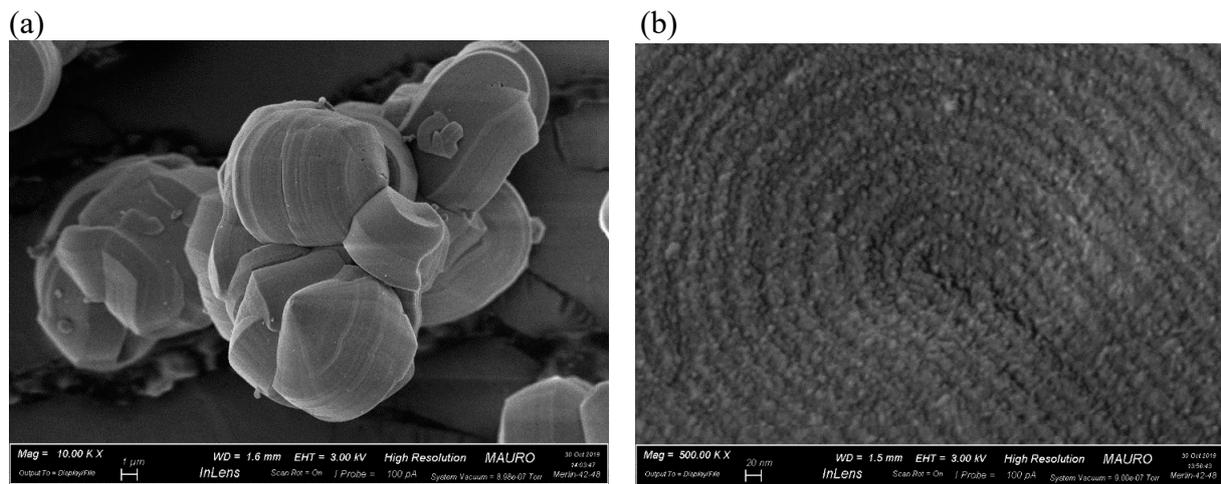


Figura 3.8 (a) e (b): Immagini del campione SBA-15.

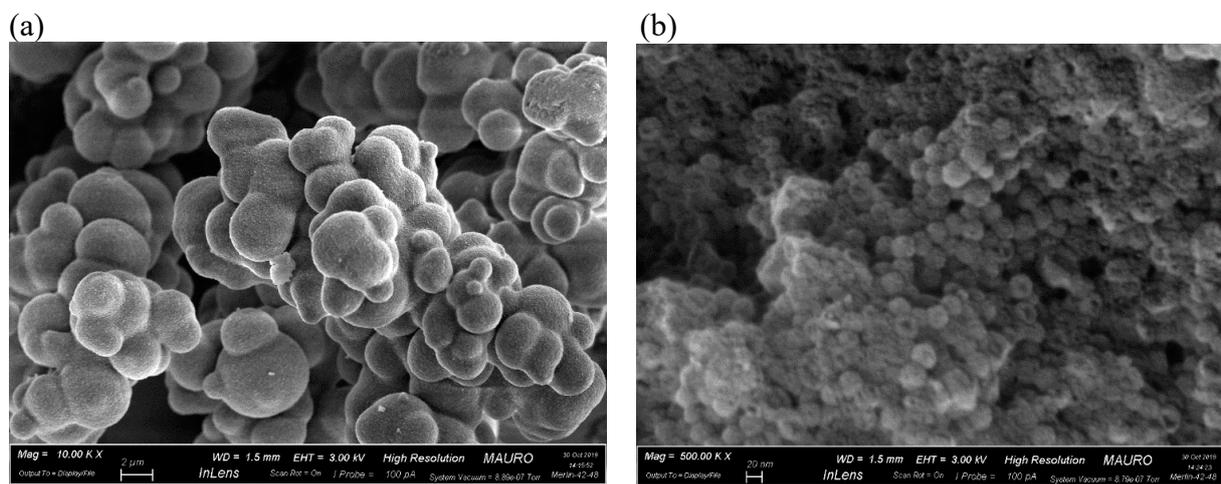


Figura 3.9 (a) e (b): Immagini del campione MCF 0.5.

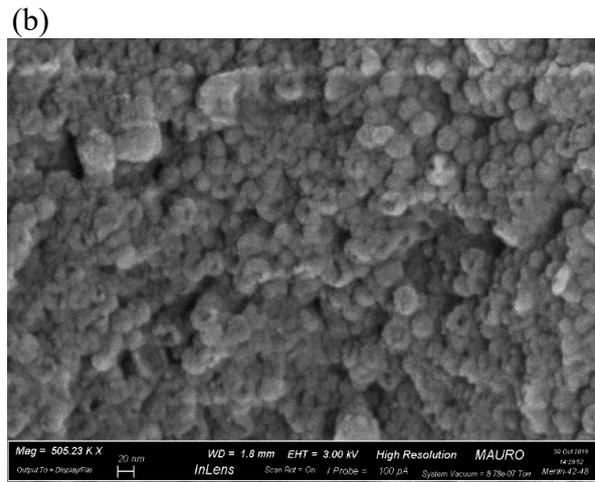
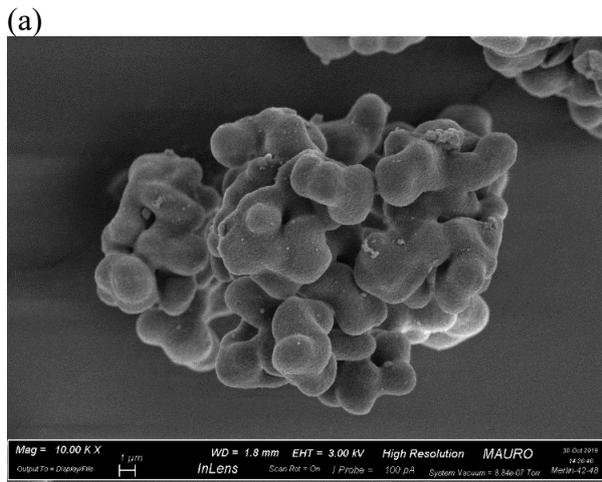


Figura 3.10 (a) e (b): Immagini del campione MCF0.75.

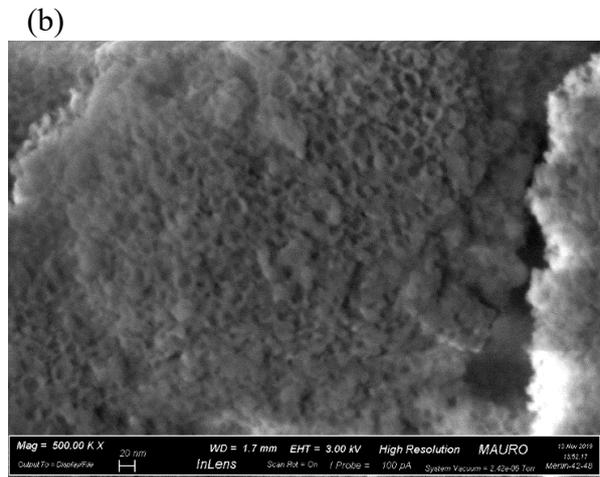
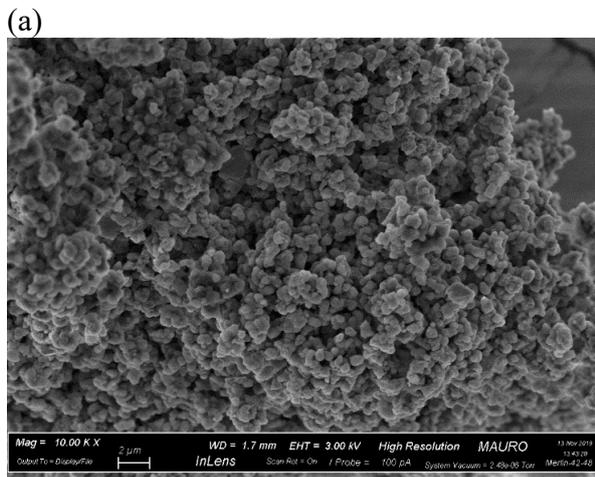


Figura 3.11 (a) e (b): Immagini del campione MSU-F.

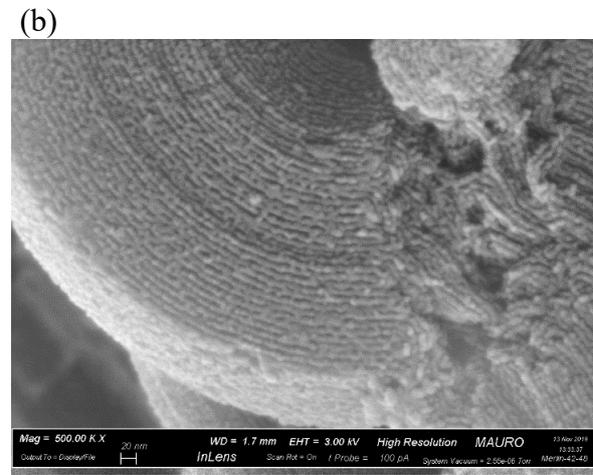
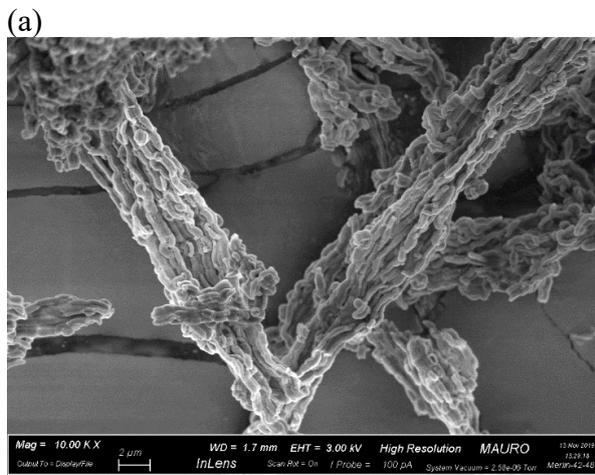


Figura 3.12 (a) e (b): Immagini del campione MSU-H.

Dalle Figure 3.8 (a), 3.9 (a), 3.10 (a), 3.11 (a) e 3.12 (a) si può vedere che questi supporti si uniscono sotto forma di agglomerati dell'ordine di qualche micron ( $\mu\text{m}$ ) [12]. Per quanto riguarda l'SBA-15, si può verificare dalla Figura 3.8 (b) che i pori hanno una geometria cilindrica allungata e sono sovrapposti l'uno sopra l'altro. Invece per i supporti MCF 0.5 e MCF 0.75 le Figure 3.9 (b) e 3.10 (b) mostrano chiaramente la struttura "spugnosa" disordinata dei supporti e a forma di sfere connesse tra di loro dai pori [7]. Inoltre, si può chiaramente vedere che i pori di questi ultimi due supporti siano irregolari. Dalle Figure 3.11 e 3.12 si può verificare che il supporto MSU-F abbia una struttura simile ai supporti MCF-tipo e che invece l'MSU-H abbia una struttura simile all'SBA-15.

### 3.2 Immobilizzazione FDH

In questo paragrafo verranno riportati i risultati delle funzionalizzazioni dei supporti silicei, le rese di immobilizzazione dell'FDH su questi ultimi e le successive prove di attività. In seguito, valutato il complesso supporto-enzima più attivo verranno riportati i risultati delle prove di carico enzimatico, stabilità termica e prove di conversione della  $\text{CO}_2$ .

#### 3.2.1 Funzionalizzazione e immobilizzazione dell'FDH sui supporti silicei

Nella Tabella 3.2 si possono vedere quanti gruppi aldeidici per grammo di supporto si sono formati in seguito al processo di funzionalizzazione descritto nel *Paragrafo 2.3*. Da letteratura, si conosce che la sintesi acida dei supporti silicei (*Paragrafo 2.1*) introduce un gran numero di gruppi ossidrilici sulla superficie, questi infatti sono poi i punti di *attacco* per il GPTMS [7]. Come si può notare, i valori sono simili per i 5 tipi di supporti silicei, inoltre si può vedere che il numero di gruppi aldeidici è proporzionale all'area superficiale ( $S_{\text{BET}}$ ). Infatti, il valore massimo di gruppi aldeidici,  $X = 291 \mu\text{mol/g}$ , si ha per l'MSU-H che ha anche la  $S_{\text{BET}}$  maggiore  $750 \text{ m}^2/\text{g}$ , e il valore minimo si ha per l'MSU-F che presenta il minor valore di  $X$ ,  $196 \mu\text{mol/g}$ , e di  $S_{\text{BET}}$   $562 \text{ m}^2/\text{g}$ . Quindi si può affermare che più grande è l'area superficiale del supporto e maggiormente il GPTMS reagisce durante la funzionalizzazione aggiungendo più gruppi aldeidici sulla superficie. Da letteratura è noto che l'aggiunta di gruppi aldeidici sui supporti silicei tramite il metodo di funzionalizzazione utilizzato, non modifica diametro medio dei pori ( $D_p$ ) e la distribuzione della dimensione dei pori [5,13].

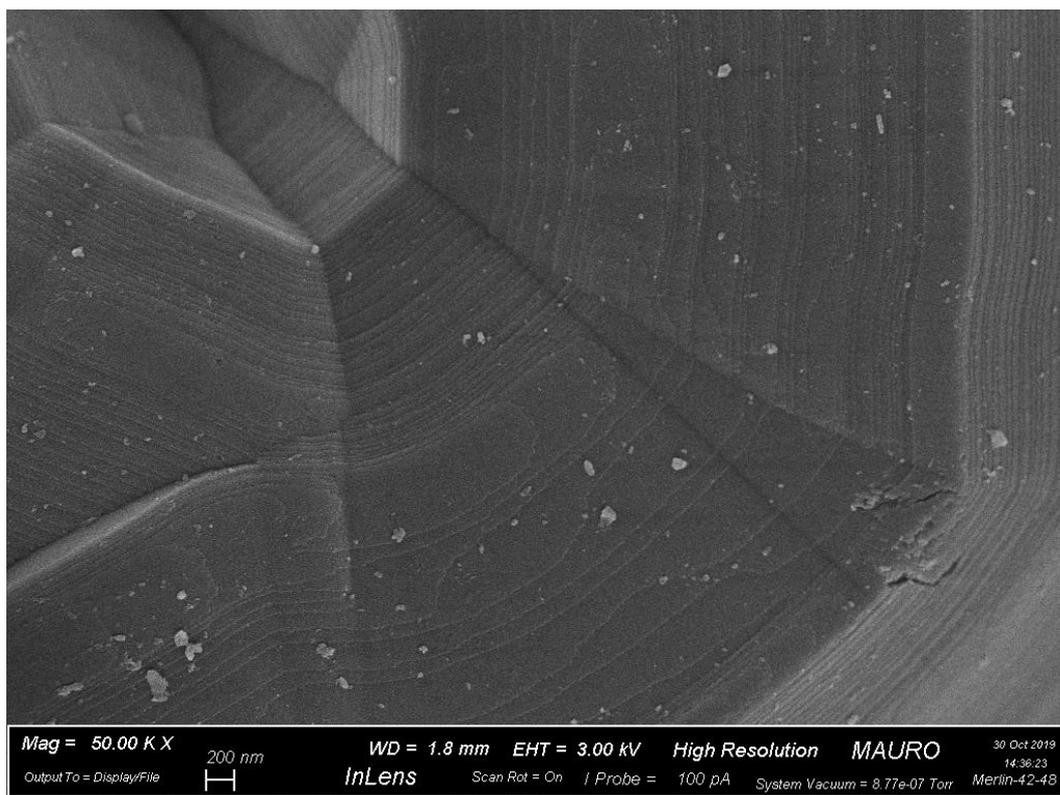
Per quanto riguarda l'immobilizzazione, i valori riportati in Tabella 3.2 si riferiscono a carichi enzimatici di 2.5 mg di proteina per g di supporto. Si può subito vedere che le rese di immobilizzazione ( $IY_p$ ) non coincidono proporzionalmente alla quantità di gruppi aldeidici ( $X$ ) presenti sul supporto. È stato visto da *Bernal C. e altri*, che la massima quantità di proteina immobilizzata su un supporto di agarosio avente  $X = 100 \mu\text{mol/g}$  è stata 10 mg per grammo di supporto. Un'ulteriore conferma che la funzionalizzazione non sia stata un fattore limitante dato che i supporti analizzati in Tabella 3.2 presentano circa  $200 \mu\text{mol/g}$  di gruppi aldeidici superficiali e il carico enzimatico è stato di 2.5 mg di proteina per grammo di supporto [17]. Se si mettono a confronto l'MSU-H e l'SBA-15 questi due supporti presentano simili valori di  $X$ , ma le rese di immobilizzazione sono alquanto diverse, per il primo 80% e per il secondo il 30%. Questa discordanza può essere dovuta alla struttura dei due materiali che è per tutte e due esagonale con pori cilindrici sovrapposti, ma si differenzia per quanto riguarda la dimensione dei pori. Infatti, l'MSU-H presenta un diametro medio dei pori ( $D_p$ ) di circa 7 nm contro i 4 nm dell'SBA-15, di conseguenza questa maggiore dimensione dei pori

consentirebbe all'enzima (6 nm di diametro) di immobilizzarsi nei pori del primo supporto. Anche per quanto riguarda i supporti con struttura "spugnosa" a forma di sfere, cioè MSU-F, MCF 0.5 e MCF 0.75 la quantità dei gruppi aldeidici (X) non è proporzionale alla resa di immobilizzazione ( $IY_P$ ). Infatti, presentano sulla superficie del supporto una quantità simile di gruppi aldeidici (circa  $X = 200 \mu\text{mol/g}$ ), ma hanno delle rese di immobilizzazione diverse. Tuttavia, al contrario dei supporti MSU-H e SBA-15 in cui la  $IY_P$  è maggiore per il supporto con  $D_p$  più elevato, per gli altri supporti è l'esatto opposto. Questo può essere spiegato considerando le dimensioni dell'enzima, circa 6 nm di diametro se approssimato a una sfera e le relative dimensioni dei pori dei supporti. Infatti, è stato visto che le migliori rese di immobilizzazione si trovano se le dimensioni del poro sono leggermente più grandi dell'enzima [14]. Se invece il poro risulta essere troppo grande allora l'enzima fa più fatica a formare dei legami con il supporto e tende poi ad essere rilasciato in soluzione.

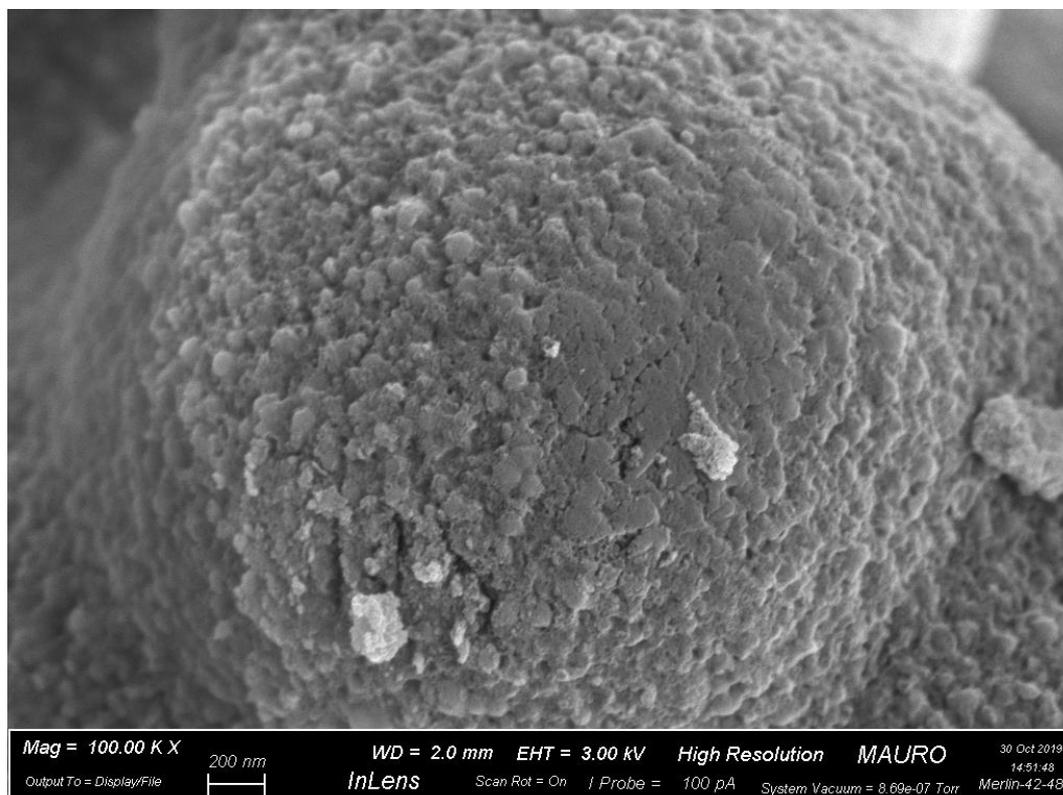
**Tabella 3.2.** Gruppi aldeidici (X) e rese di immobilizzazione ( $IY_P$ ) con carico enzimatico di 2.5 mg per g di supporto, per i vari supporti utilizzati

<b>Tipi di supporti</b>	<b>X (<math>\mu\text{mol}</math> aldeidi / g supporto)</b>	<b><math>IY_P</math></b>
MSU-F	196	70%
MSU-H	291	80%
SBA-15	276	30%
MCF 0.5	204	62%
MCF 0.75	215	48%

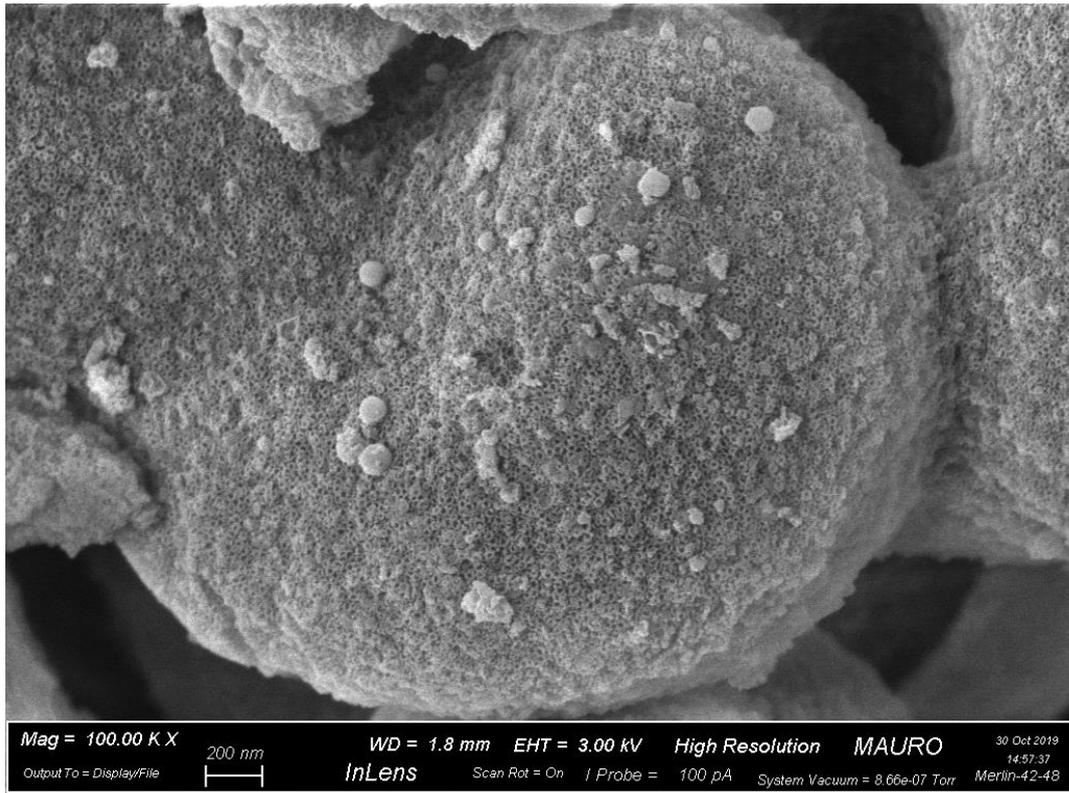
In seguito, sono riportate le immagini FE-SEM dei campioni sintetizzati (SBA-15, MCF 0.5 e MCF 0.75) in seguito all'immobilizzazione dell'enzima FDH.



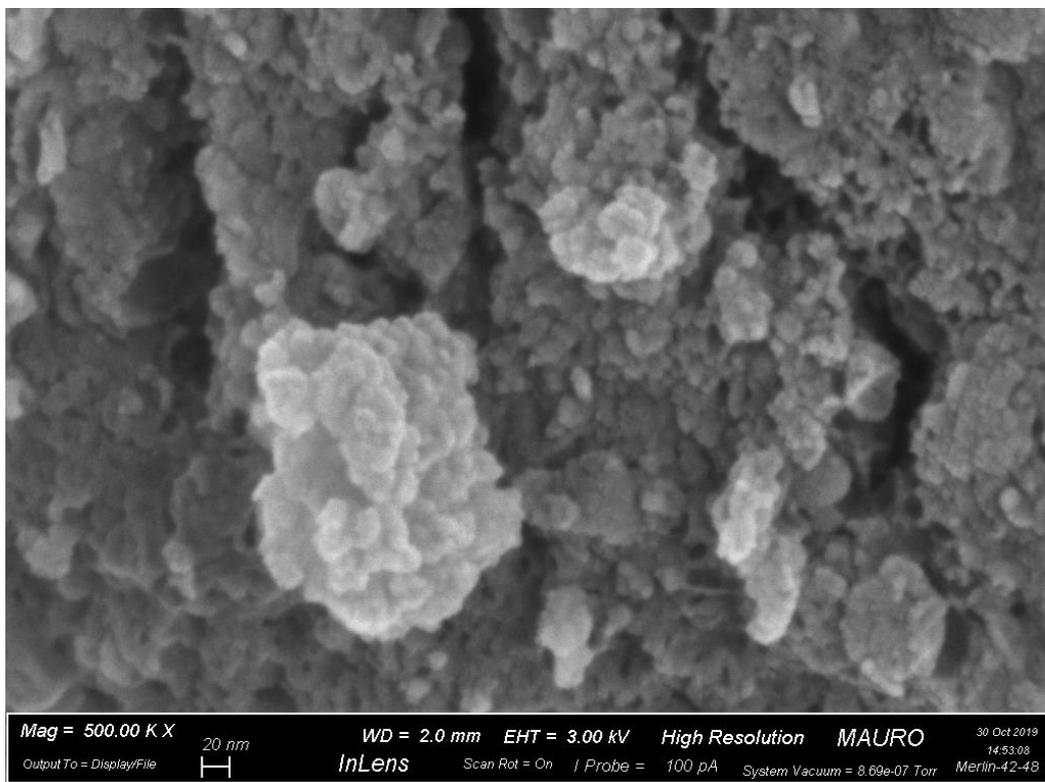
**Figura 3.13:** Immagini FE-SEM del supporto SBA-15 dopo immobilizzazione di FDH con carico enzimatico di 2.5 mg/g



**Figura 3.14:** Immagini FE-SEM del supporto MCF 0.5 dopo immobilizzazione di FDH con carico enzimatico di 2.5 mg/g



**Figura 3.15:** Immagini FE-SEM del supporto MCF 0.75 dopo immobilizzazione di FDH con carico enzimatico di 5 mg/g.



**Figura 3.16:** Immagini FE-SEM del supporto MCF 0.75 dopo immobilizzazione di FDH con carico enzimatico di 2.5 mg/g, particolare ingrandito.

Dalle Figure 3.13, 3.14 e 3.15 si può avere approssimativamente un'idea di come l'enzima FDH si immobilizzi sui supporti sintetizzati (SBA-15, MCF 0.5 e MCF 0.75). Infatti, si può notare in queste immagini FE-SEM la presenza di particelle globulari più chiare sulla superficie del supporto, quasi del tutto assenti nelle immagini FE-SEM dei supporti visti in precedenza (Figure 3.8, 3.9 e 3.10) che non hanno reagito con l'enzima. Quindi si può assumere che queste particelle siano effettivamente l'enzima FDH immobilizzato sulla superficie del supporto sotto forma di agglomerati grandi anche qualche centinaio di nanometri (Figura 3.16). Per quanto riguarda l'SBA-15, si può immediatamente vedere che l'enzima in questo caso si immobilizza principalmente sulla superficie del supporto, in accordo con *Balistreri N. e altri* [15]. Questo è dovuto al fatto che i pori dell'SBA-15 di diametro di 4 nm, non sono sufficientemente grandi da permettere all'FDH (diametro di circa 6 nm) di immobilizzarsi all'interno di essi. Infatti, si è visto prima (Tabella 3.2) che la resa di immobilizzazione su questo supporto è relativamente bassa (30 %) se comparata con l'MSU-H (80 %) che ha dei pori in teoria sufficientemente grandi ( $D_p = 7$  nm), da ospitare l'enzima. Dalle Figure 3.16 e 3.18 si può notare la presenza di enzimi sulla superficie di MCF 0.5 e MCF 0.75, si suppone inoltre che l'enzima sia anche immobilizzato dentro le cavità dei supporti. Questi, come dimostrato in precedenza, avrebbero dei pori maggiori di 20 nm e delle finestre dal diametro maggiore di 10 nm quindi sufficientemente grandi da ospitare e da permettere all'FDH di diffondersi al loro interno.

### 3.2.2 Attività enzimatica

Per misurare l'attività degli enzimi immobilizzati sono stati utilizzati i supporti con carico enzimatico di 2.5 mg per g di supporto, con caratteristiche ( $X$  e  $IY_p$ ) e descritte nella Tabella 3.2. Come visto nel *Paragrafo 2.5*, la misura di attività per l'FDH è stata calcolata tramite il valore di incremento di assorbanza del NADH. Quest'ultimo è stato ricavato tramite i valori di assorbanza trovati a 1, 2 e 3 minuti di reazione tra FDH e formiato di sodio. Nella Tabella 3.3 sono riportati i valori, dell'enzima immobilizzato, di attività riferita ai mg di enzima presenti sul supporto ( $UI_{mg}$ ), riferita ai grammi di supporto ( $UI_g$ ) e il valore di attività relativa ( $A_{REL}$ ). Si riportano i valori per i 5 tipi di supporto analizzati: MSU-F, MSU-H, SBA-15, MCF 0.5 (rapporto Mesitilene/Pluronic 0.5) e MCF 0.75 (rapporto Mesitilene/Pluronic 0.75).

**Tabella 3.3.** Attività riferite ai mg di enzima ( $UI_{mg}$ ) e ai grammi di supporto ( $UI_g$ ) e Attività relativa ( $A_{REL}$ ) per i vari supporti

Tipi di supporti	$UI_{mg}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ )	$UI_g$ ( $\mu\text{mol}/\text{min g}$ )	$A_{REL}$
MSU-F	0.72	1.44	13%
MSU-H	0.28	0.55	5%
SBA-15	0.61	0.32	11%
MCF 0.5	0.55	0.75	9%
MCF 0.75	1.01	1.03	18%

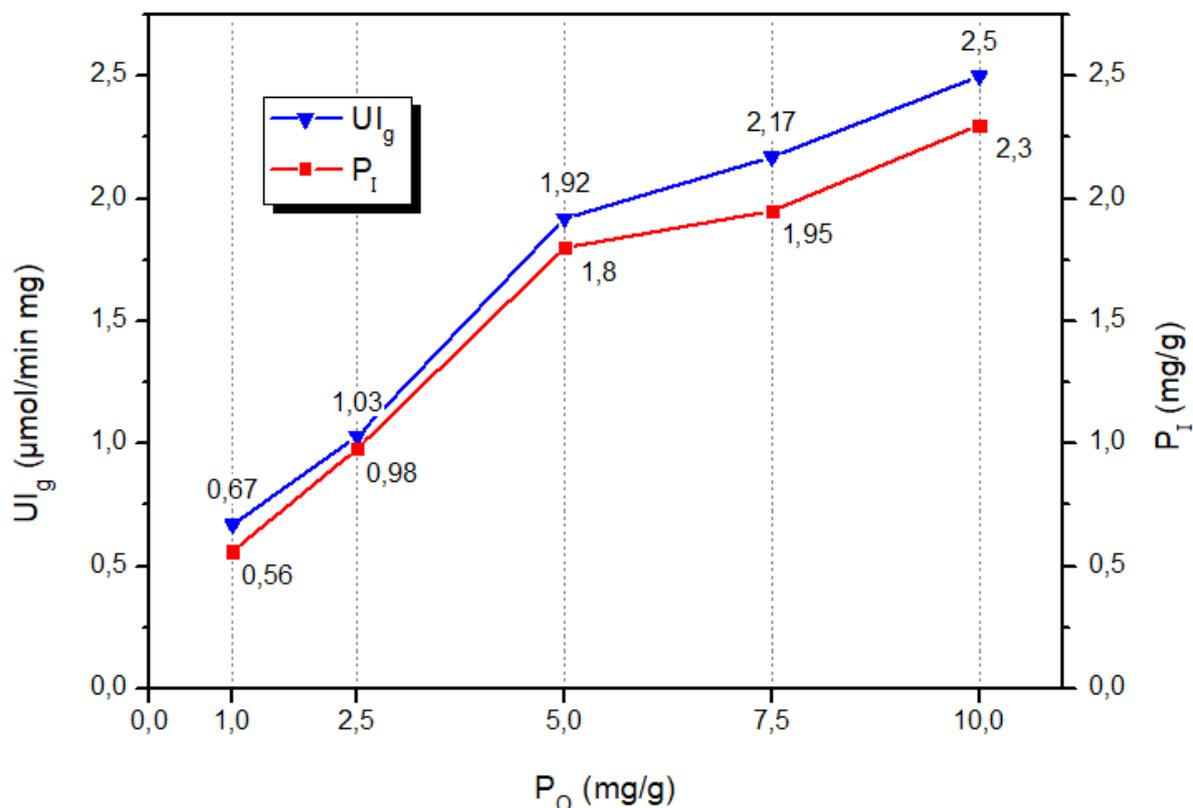
In generale il valore  $UI_{mg}$  rappresenta “l’efficienza” dell’enzima immobilizzato, infatti esso considera il valore di attività (UI) per mg di enzima immobilizzato, e quindi è indipendente dalla quantità di enzima presente sul supporto. Invece il valore  $UI_g$  prende in considerazione la resa di immobilizzazione e si può quindi considerare come un valore di “efficienza” totale del sistema supporto più enzima immobilizzato. L’ $A_{REL}$  invece mette in relazione l’attività ( $UI_{mg}$ ) del sistema immobilizzato con l’attività ( $UI_{mg}$ ) dell’enzima in soluzione. Complessivamente si può notare che le attività relative ( $A_{REL}$ ) di tutti i componenti siano inferiori al 20 %, quindi una volta immobilizzato l’enzima perde buona parte della sua attività. Questo può essere dovuto a diversi fenomeni, come la denaturazione dell’FDH in seguito all’immobilizzazione, infatti i legami covalenti instaurati tra il supporto e l’enzima potrebbero influire negativamente sulla struttura tridimensionale proteica e quindi alterarne l’attività. È stato visto da *Bolivar J. M. e altri* che l’utilizzo di boroidruro di sodio ( $NaBH_4$ ) per ridurre i legami di Schiff durante la reazione di immobilizzazione (*Paragrafo 2.4*) è probabilmente una causa rilevante della denaturazione proteica [16]. Però l’utilizzo di boroidruro è stato dimostrato necessario per mantenere l’attività dell’enzima nel tempo, altrimenti i deboli legami di Schiff non sarebbero in grado di trattenere l’enzima legato al supporto. Per proteggere l’enzima dal boroidruro durante l’immobilizzazione è stato utilizzato glicerolo (*Paragrafo 2.4*). Un’altra causa della perdita di attività sarebbe dovuta all’immobilizzazione all’interno dei pori che potrebbe causare un eccessivo irrigidimento della proteina, limitando i cambiamenti strutturali durante la sua attività catalitica. Oltretutto, ci potrebbero essere anche dei problemi per quanto riguarda la diffusione di substrato all’interno dei pori dovuti al bloccaggio di questi da parte dell’enzima immobilizzato e alla lontananza dalla superficie esterna del supporto, cioè dalla fonte di substrato. [15,17]

I risultati in Tabella 3.3 mostrano che la diffusione all’interno dei pori possa essere una delle cause della perdita di attività dell’FDH immobilizzato. Infatti, se si confrontano i supporti MSU-H e SBA-15 che hanno strutture simili ma dimensioni dei pori diverse, si può notare che la  $UI_{mg}$  sia maggiore per l’SBA-15 (0.61  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) rispetto all’MSU-H (0.28  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ). Questo conferma che nel supporto MSU-H, che ha una resa di immobilizzazione decisamente più alta dell’SBA-15 ( $IY_P = 80\%$  contro il  $IY_P = 30\%$ ), gli enzimi risultano meno “efficienti” in quanto molti probabilmente collocati dentro i pori. Infatti, come quanto ipotizzato in precedenza, gli enzimi all’interno dei pori potrebbero avere a disposizione meno substrato di quelli posizionati all’esterno della superficie del supporto. Inoltre, l’enzima all’interno dei pori potrebbe anche essere eccessivamente irrigidito da multipli legami covalenti e quindi essere meno attivo. Un’altra conferma della limitazione di diffusione all’interno dei pori dei supporti e di un possibile elevato irrigidimento dell’enzima si ha confrontando i valori di MCF 0.5 e MCF 0.75. Infatti, il secondo supporto presenta dei pori e delle finestre maggiori del primo e la sua attività  $UI_{mg}$  è maggiore (1.01 contro 0.55  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ). Quindi è probabile che l’FDH all’interno dei pori dell’MCF 0.75 riesca a mantenere maggiormente la sua attività anche se una frazione minore se ne immobilizza rispetto all’MCF 0.5. Al contrario, l’attività totale dell’MSU-F ( $UI_g = 1.44 \mu\text{mol}/\text{min g}$ ) che ha dimensioni media dei pori di 15 nm è risultata più alta di MCF 0.75 ( $UI_g = 1.03 \mu\text{mol}/\text{min g}$ ) che ha dimensioni media dei pori di circa 25 nm. Questo è in contrasto con quanto visto per MCF 0.5 e MCF 0.75 dove la maggiore dimensione dei pori assicurava una maggiore attività enzimatica (sia per  $UI_{mg}$  che per  $UI_g$ ). Nel caso della maggiore attività dell’MSU-F bisogna considerare anche la dimensione e la forma degli aggregati di celle sferiche. Infatti, come visto da *Valle Gomes M. Z.*, una minore dimensione degli aggregati di particelle di silice consente una maggiore attività dell’enzima immobilizzato [14]. Si può vedere dalla Figura 3.11 (a) che le dimensioni degli aggregati di particelle di silice dell’MSU-F sono minori di quelle di MCF 0.5 e MCF 0.75 (Figure 3.9 (a) e 3.10 (a)). Quindi si può affermare che l’enzima immobilizzato all’interno dei pori di MSU-F sente meno della limitazione di

diffusione di substrato al contrario degli altri supporti MCF-tipo. Tuttavia, “l’efficienza enzimatica” maggiore si trova per l’MCF 0.75, quindi la dimensione dei pori rimane un parametro fondamentale per l’attività enzimatica all’interno di esso. [14] Per stabilire però l’efficienza complessiva del sistema supporto più enzima è necessario confrontare i valori di  $UI_g$  dei diversi sistemi. Dalla Tabella 3.3 si vede che i valori più alti si trovano per i supporti MSU-F (1.44  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) e per MCF 0.75 (1.03  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ). L’MCF 0.75, anche se presenta una bassa resa di immobilizzazione (48 %) rispetto all’MSU-F (70 %) ha comunque una  $UI_g$  comparabile a quest’ultimo e una  $UI_{mg}$  maggiore. Quindi è stato selezionato per le successive prove in quanto considerato sistema supporto più enzima complessivamente più efficiente degli altri.

### 3.2.3 Ottimizzazione dell’immobilizzazione di FDH sul supporto MCF 0.75

Come spiegato nel paragrafo precedente, l’MCF 0.75 è stato selezionato per delle prove successive, tra cui l’ottimizzazione dell’immobilizzazione. Questa è stata conseguita variando il carico proteico offerto ( $P_O$ ) per la reazione di immobilizzazione al supporto e in seguito si è valutata l’attività ( $UI_g$ ) per ogni carico proteico. In Figura 3.19 sono rappresentati i risultati della quantità di proteina immobilizzata ( $P_I$ ) e attività ( $UI_g$ ) in seguito a carichi proteici offerti ( $P_O$ ) al supporto MCF 0.75 di 1, 2.5, 5, 7.5 e 10 mg/g. L’MCF 0.75 è stata precedentemente funzionalizzata con la stessa quantità di gruppi aldeidici sulla superficie del supporto per tutte le diverse immobilizzazioni.



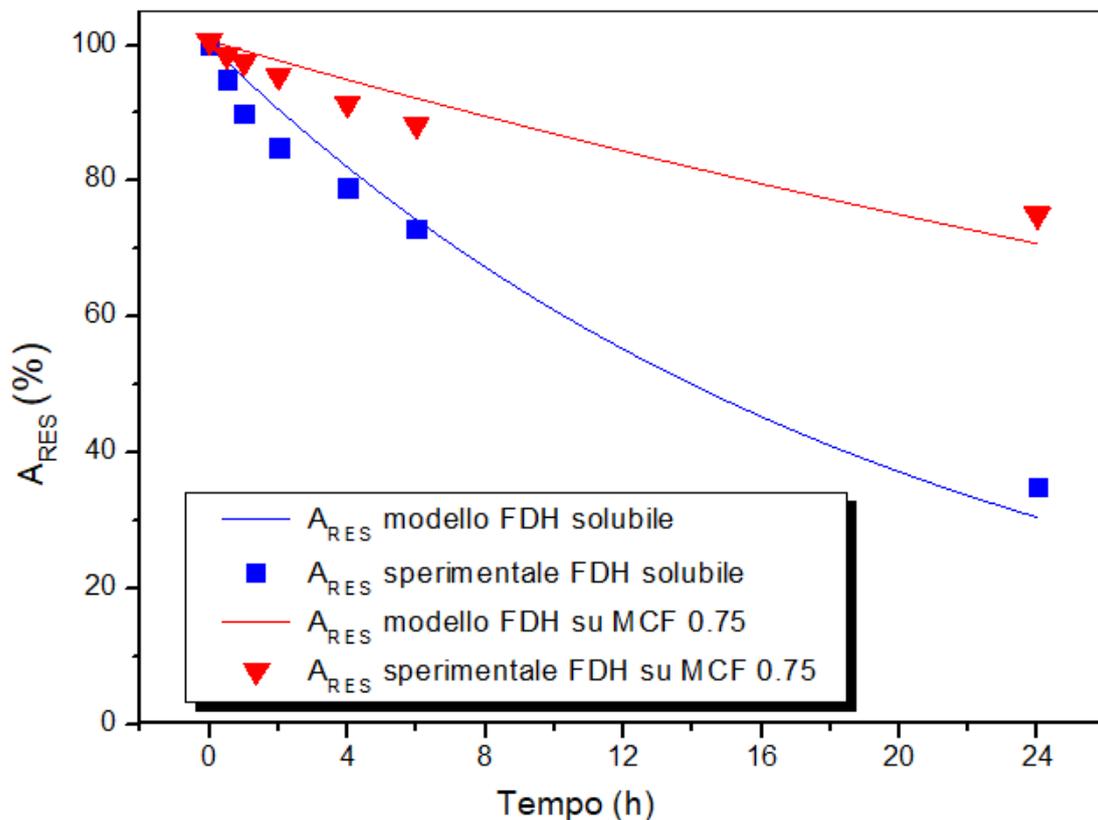
**Figura 3.17:** Quantità di proteina immobilizzata ( $P_I$ , linea rossa e valori sotto le linee in mg/g) e  $UI_g$  (linea blu e valori sopra le linee in  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) di FDH (formiato deidrogenasi) immobilizzata su MCF 0.75 (silice mesoporosa) funzionalizzata con gruppi aldeidici, per diversi carichi proteici ( $P_O$ ).

Come si può vedere nella Figura 3.17, la linea che rappresenta la quantità di proteina immobilizzata ( $P_I$ ) sul supporto (linea rossa) ha più o meno lo stesso andamento della linea che rappresenta la  $UI_g$  (linea blu). Però si può notare una decrescita nelle rese di immobilizzazione aumentando la quantità di  $P_O$ , da circa il 40 % (con  $P_O = 1$  mg/g) al 23 % (con  $P_O = 10$  mg/g). Questo è dovuto al fatto che maggiori quantità di enzimi sono presenti in soluzione durante l'immobilizzazione e minore è la probabilità che questi possano reagire con i gruppi funzionali presenti sul supporto.

È stato visto che l'utilizzo di un carico proteico ( $P_O$ ) per l'immobilizzazione di 5 mg/g ha dato dei buoni risultati. Infatti, si può vedere che la quantità di proteine immobilizzate ( $P_I$ ) è di 1.8 mg/g che è poco minore della quantità di  $P_I$  usando 10 mg/g di proteina offerta (2.3 mg/g); lo stesso discorso vale per la  $UI_g$ . Di conseguenza si è deciso di utilizzare questo carico enzimatico (5 mg/g) per le prove successive dato che rappresenta una buona combinazione tra proteina offerta ( $P_O$ ) e attività ( $UI_g$ ).

### 3.2.4 Stabilità termica

È stata inoltre studiata la stabilità termica dell'enzima immobilizzato utilizzando il supporto MCF 0.75 con carico proteico offerto di 5 mg/g. In Figura 3.18 si può vedere l'attività residua ( $A_{RES}$ ) in termini percentuali del sistema immobilizzato e dell'enzima solubile a 50 °C per 24 h.



**Figura 3.18:** Attività residua ( $A_{RES}$ ) per l'FDH solubile e immobilizzato su MCF 0.75 a 50 °C. I valori sperimentali sono rappresentati dai simboli: ■ FDH solubile, ▼ FDH immobilizzato su MCF 0.75. I modelli corrispondenti ai valori sperimentali sono rappresentati dalle linee continue: blu per l'FDH solubile e rossa per l'FDH immobilizzato su MCF 0.75.

Si può notare che per tempi di incubazione minori di 1 h, l'attività residua ( $A_{RES}$ ) dell'enzima solubile e di quello immobilizzato rimangono praticamente invariati [15]. Invece, per tempi maggiori di 4-6 h si può notare come l' $A_{RES}$  dell'FDH solubile decresca maggiormente dell' $A_{RES}$  dell'FDH immobilizzato. Infatti, dopo 24 h di incubazione a 50 °C l'attività residua per l'enzima immobilizzato è del 75 % contro il 35 % dell'enzima solubile. Come si può vedere dalla Figura 3.18, il modello di disattivazione termica utilizzato descrive in modo soddisfacente la riduzione di attività nel tempo sia dell'FDH solubile che di quello immobilizzato. I valori di  $k_D$  (costante cinetica della velocità di disattivazione termica),  $t_{1/2}$  (tempo di dimezzamento),  $R^2$  (coefficiente di determinazione del modello) e SF (fattore di stabilità termica) sono riportati in Tabella 3.4. Si può vedere dal valore di SF che è stato incrementato il tempo di dimezzamento ( $t_{1/2}$ ) dell'FDH di 3.5 volte grazie all'immobilizzazione su MCF 0.75. La disattivazione termica dell'enzima è una conseguenza dell'indebolimento dei legami intramolecolari (legami idrogeno) che conferiscono all'enzima la sua struttura tridimensionale, fondamentale per la sua attività catalitica. L'immobilizzazione, attraverso dei legami covalenti, provoca un "irrigidimento" dell'enzima che gli permette di conservare maggiormente la sua struttura tridimensionale durante l'incubazione a 50 °C. Di conseguenza la sua attività decresce in modo minore rispetto all'enzima solubile. [24]

**Tabella 3.4.** Parametri della disattivazione termica dell'FDH solubile e immobilizzato su MCF 0.75 determinati tramite un modello del primo ordine a uno stadio.

	$k_D$ ( $h^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)	$R^2$	SF
FDH solubile	$5.0 * 10^{-2}$	14	0.97	/
FDH immobilizzato	$1.4 * 10^{-2}$	49	0.99	3.5

### 3.2.5 Reazione con la $CO_2$

Anche per queste prove è stato utilizzato il supporto MCF 0.75 con carico proteico di 5 mg/g di cui 1.8 mg di FHD effettivamente immobilizzato per g di supporto, oltre all'FDH in soluzione. Come spiegato nel *Paragrafo 2.7*, l'obiettivo di queste prove consiste nel misurare la quantità di acido formico prodotto dall'FDH a partire dalla  $CO_2$ . Tuttavia, i risultati si sono rivelati poco soddisfacenti in quanto non si è riuscito a vedere più di 15.2 ppm di acido formico prodotto utilizzando l'FDH solubile e 7.3 ppm per l'FDH immobilizzato. Inoltre, non è stato possibile correlare i dati di assorbanza del NADH con la produzione di acido formico a causa della disattivazione del cofattore nella soluzione tampone. Nella Tabella 3.5 sono riportati i valori massimi di concentrazione (ppm e mM) di acido formico prodotti in continuo e in discontinuo (batch) per l'FDH solubile e immobilizzato su MCF 0.75.

**Tabella 3.5.** Valori massimi di concentrazione di acido formico prodotti dall'FDH solubile e immobilizzato su MCF 0.75 per prove con CO<sub>2</sub> flussata in continuo (15 ml/min) e per le prove batch.

Prove CO <sub>2</sub>	Metodo	Massimo valore di acido formico prodotto (ppm)	Massimo valore di acido formico prodotto (mM)
FDH solubile	Continuo 6 h	6.1	0.13
	Batch 6 h	5.4	0.12
	Batch 18 h	15.2	0.33
FDH immobilizzato	Continuo 6 h	3.8	0.082
	Batch 6 h	3.6	0.078
	Batch 18 h	7.3	0.16

Come si può vedere dai risultati in Tabella 3.5, le prove in continuo non hanno dato risultati più soddisfacenti di quelle batch. È stato inoltre possibile condurre le prove batch per una durata di 18 h ed è stato rilevato un aumento della concentrazione di acido formico fino a 15.2 ppm per l'FDH solubile e 7.3 ppm per l'FDH immobilizzato. Si è dimostrato che il modo di condurre la reazione, in continuo o batch, non ha influito sui risultati, quindi la tipologia batch è risultata la migliore poiché prevede un utilizzo minore di CO<sub>2</sub> ed è stato possibile condurre prove più a lungo. Si può inoltre vedere che i valori di concentrazione di acido formico per l'FDH immobilizzato sono circa la metà di quelli trovati utilizzando l'FDH solubile (Tabella 3.5). Le unità di attività (UI) presenti nel reattore sono rispettivamente 41 μmol/min per l'FDH solubile e 0.47 μmol/min per l'FDH immobilizzato. Da questo si trova che la velocità di mass transfer della CO<sub>2</sub> disciolta in soluzione rappresenta un grande fattore limitante in quanto la produzione di acido formico non dipende direttamente dalla quantità di attività enzimatica presente in soluzione. Un miglioramento possibile della velocità di mass transfer della CO<sub>2</sub> in acqua è quello di condurre la reazione a pressioni più elevate, ad esempio a 5 bar. Infatti, considerando la legge di Henry per il discioglimento di gas nei liquidi (3.1), aumentando la pressione da 1 bar a 5 bar si avrebbe 5 volte la concentrazione di CO<sub>2</sub> disciolta in acqua, cioè da 34 mM a 160 mM, con  $k_H = 3.4$  (mol/bar L) considerando la soluzione come acqua pura satura di CO<sub>2</sub>. Un altro metodo per migliorare il mass transfer gas-liquido, è quello di immettere la CO<sub>2</sub> in modo più efficace nella soluzione.

$$C = k_H * P \quad (3.1)$$

$C$  = concentrazione di gas in acqua (M)

$k_H$  = costante di Henry (mol/bar L)

$P$  = pressione del gas sulla soluzione (bar)

I valori sperimentali di acido formico prodotto dall'FDH solubile sono risultati in accordo con *Choe H. e Kim Y.* confermando quindi che un'altra grande limitazione sia data dalla bassa attività FDH derivante da *Candida boidinii* [18,19]. Infatti, è stato visto da *Nabavi Zadeh P. S. e altri* che la reazione catalizzata da FDH che porta alla formazione di acido formico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) da anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) (equazione 3.2) è 30 volte meno veloce della reazione inversa. La soluzione più promettente è quindi immobilizzare nella stessa matrice la F<sub>ald</sub>DH (formaldeide deidrogenasi) in modo da rimuovere l'acido formico non appena si forma trasformandolo in formaldeide (CH<sub>2</sub>O) (equazione 3.3) e ridurre di molto quindi la reazione inversa dell'FDH. Infatti, è stato dimostrato (da *Nabavi Zadeh P. S. e altri*) che un rapporto 1:15 di FDH su F<sub>ald</sub>DH immobilizzati su MCF porti a rese decisamente più alte rispetto a un rapporto 1:1, dimostrando quindi l'importanza di ridurre la reazione inversa dell'FDH [20].



Data la velocità elevata di riconversione dell'acido formico da parte dell'FDH, sono stati analizzati due processi di disattivazione enzimatica per l'enzima solubile per rendere più efficaci le misurazioni con l'HPLC. Infatti, una volta prelevato il campione dalla soluzione di reazione e messo nelle eppendorf (*Paragrafo 2.7*), si variano le condizioni per l'enzima, soprattutto per quanto riguarda la CO<sub>2</sub> disciolta, aumentando il rischio di riconversione dell'acido formico. Quindi una disattivazione termica, a 90 °C per 5 min, e una chimica, con soluzione 0.1 M di HCl, sono state analizzate utilizzando il metodo batch per 18 h. Tuttavia, queste hanno portato a risultati praticamente uguali, come si può vedere in Tabella 3.6, rendendo indifferente l'utilizzo di un metodo o l'altro. Inoltre, è stato visto da *Choe H. e altri* che a pH più alcalini l'attività dell'FDH solubile presentava valori più alti di attività [19]. Quindi sono state effettuate prove batch per 18 h, partendo da due soluzioni tampone fosfato a pH diversi, una a pH = 8, soluzione *a* e l'altra a pH = 7, soluzione *b*. È stato visto che, le soluzioni sono passate rispettivamente a pH = 7 e a pH = 6 a causa del discioglimento della CO<sub>2</sub>. Tuttavia, le massime concentrazioni di acido formico rilevate sono state maggiori per la soluzione *a*, quella a pH maggiore (Tabella 3.6). È stata riscontrata, tramite misura dell'assorbanza, una diminuzione di concentrazione del NADH di circa il 20% nella soluzione *a* e circa il 50% nella soluzione *b*. La conferma della disattivazione del NADH è data dal confronto tra acido formico prodotto e diminuzione di concentrazione del NADH. Infatti, se la diminuzione di concentrazione del NADH venisse considerata come una conversione del cofattore ad acido formico allora dovremmo avere un rapporto 1:1 di conversione (equazione 3.2). Dato che la concentrazione iniziale di NADH era di 10 mM, di conseguenza dovrebbe essere stata ottenuta una concentrazione finale di 2 mM di acido formico per la soluzione *a* e 5 mM per la soluzione *b*. Tuttavia, si può vedere nella Tabella 3.6 i valori di acido formico prodotto non superano i 0.33 mM, quindi non si può correlare la diminuzione di concentrazione del NADH misurata tramite spettrofotometro, con la concentrazione di acido formico rilevata tramite HPLC. In conclusione, è stato visto che la soluzione *a* è risultata essere la migliore poiché il NADH si è degradato in modo minore e le concentrazioni di acido formico sono risultate maggiori.

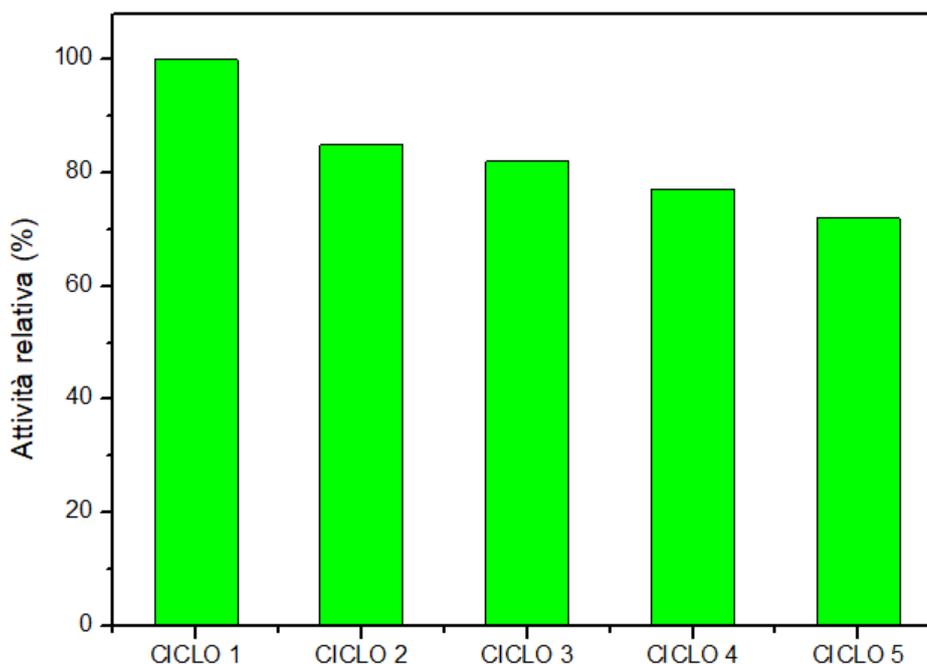
**Tabella 3.6.** Valori massimi di concentrazione di acido formico (ppm e mM) prodotti dall'FDH solubile analizzando due metodi di disattivazione enzimatica e due pH della soluzione tampone. Tutte le prove sono state condotte in discontinuo (batch) per 18 h.

Prove CO <sub>2</sub>		Massimo valore di acido formico prodotto (ppm)	Massimo valore di acido formico prodotto (mM)
Metodo di disattivazione enzimatica	Termica <sup>a</sup>	15.2	0.33
	Chimica <sup>b</sup>	14.9	0.32
pH soluzione	a) 7	15.2	0.33
	b) 6	12.5	0.27

<sup>a</sup> Incubazione a 90 °C per 5 minuti.

<sup>b</sup> Utilizzo di una soluzione acida: HCl 0.1 M.

Sono state svolte delle prove sul riutilizzo dell'FDH immobilizzato su MCF 0.75 e i risultati sono riportati in Figura 3.19. Per ogni ciclo il sistema immobilizzato è stato fatto reagire per 6 h con flusso di CO<sub>2</sub> in discontinuo (batch). L'attività (U<sub>lg</sub>) è stata calcolata tramite il metodo descritto nel *Paragrafo 2.5* e non tramite la concentrazione di acido formico prodotta poiché i valori trovati risultavano troppo bassi e imprecisi. Si può notare che dopo 5 cicli il biocatalizzatore abbia conservato un'attività di circa il 70% che è un valore promettente per possibili sviluppi pratici.



**Figura 3.19:** Riutilizzabilità dell'FDH (formiato deidrogenasi) immobilizzato su MCF 0.75 dopo 5 cicli di reazione con la CO<sub>2</sub>.

## 4. Lavori futuri

Come è stato visto in questo lavoro e in altri, l'enzima CbFDH (formiato deidrogenasi) utilizzato in questa tesi (da *Candida boidinii*) presenta un'attività molto bassa verso la conversione di CO<sub>2</sub> in acido formico [18,19]. È stato visto che esistono altri FDH, NAD-dipendenti come TsFDH (da *Thiobacillus sp. KNK65MA*), che presentano un'attività decisamente più alta rispetto a CbFDH. Ad esempio, *Choe H.* e altri hanno visto che l'attività di TsFDH verso la conversione di CO<sub>2</sub> ad acido formico risulta essere 21 volte più alta di CbFDH [19]. Inoltre, gli enzimi FDH di tipo metallo-dipendenti sono molto più attivi di quelli NAD-dipendenti verso la conversione di CO<sub>2</sub>, tuttavia questi presentano una bassa tolleranza all'ossigeno e quindi difficilmente utilizzabili per applicazioni industriali [21]. Quindi, è necessario trovare, tramite mutazione genetica o in altri organismi, degli enzimi formiato deidrogenasi (FDH) con un'alta attività verso la conversione di CO<sub>2</sub> in acido formico che al tempo stesso tollerino la presenza di ossigeno per future applicazioni industriali.

Per quanto riguarda i supporti silicei, si è visto che i supporti MCF-tipo sono promettenti per l'immobilizzazione di enzimi a causa della loro struttura "spugnosa" mesoporosa. In futuro si potrebbe ricercare specificamente un supporto di tipo MCF in modo da ottimizzare il diametro dei pori e la grandezza e la forma degli aggregati di silice per garantire la massima resa di immobilizzazione e attività enzimatica. Infatti, è stato visto che questi parametri del supporto sono fondamentali per via delle limitazioni alla diffusione di substrato e dell'ingombro sterico dell'enzima all'interno dei pori. Inoltre, è stato visto da *Nabavi Zadeh P. S.* e altri che l'immobilizzazione congiunta di FDH e F<sub>ald</sub>DH nello stesso supporto porta ad un miglioramento dell'efficienza catalitica poiché riduce la riconversione dell'acido formico a CO<sub>2</sub> dell'FDH [20]. Quindi, si potrebbe provare a immobilizzare su un supporto MCF-tipo i tre enzimi della reazione a catena per la produzione di metanolo (FDH, F<sub>ald</sub>DH e ADH). Infatti, è stato dimostrato in molti studi che l'immobilizzazione dei tre enzimi dentro un supporto causa un aumento della concentrazione locale dei reagenti e quindi un miglioramento dell'attività enzimatica rispetto ai tre enzimi in soluzione [21,22]. È stato visto in altri lavori che le silici mesoporose possono essere funzionalizzate in altri modi, ad esempio utilizzando APTES (amminopropiltrimetossilano) e MTPS (3-mercaptopropiltrimetossilano) e sono state riscontrate delle buone rese di immobilizzazione e attività enzimatica [15,20]. Quindi si potrebbe analizzare l'effetto di diverse funzionalizzazioni sull'immobilizzazione di questi tre enzimi su un supporto MCF-tipo e selezionare il più efficace.

Un altro passo fondamentale verso l'utilizzo a livello industriale è rappresentato dalla rigenerazione del cofattore NADH/NAD<sup>+</sup>. Infatti, questo è molto costoso e quindi è necessario la sua rigenerazione *in situ* tramite elettrodi o tramite degli altri enzimi specifici [21]. È stato visto in altri lavori che è possibile ottenere la rigenerazione di questo cofattore e avere delle rese di produzione del metanolo significanti in sistemi in cui i tre enzimi (FDH, F<sub>ald</sub>DH e ADH) e il cofattore NADH/NAD<sup>+</sup> vengono immobilizzati sullo stesso supporto [22,23]. Quindi si potrebbe studiare un sistema in cui gli enzimi e il cofattore vengono immobilizzati nelle silici mesoporose dove avviene la rigenerazione del NADH tramite elettrodi.



## 5. Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro è stata la valutazione dell'effetto dell'immobilizzazione dell'enzima FDH (formiato deidrogenasi) su dei supporti silicei mesoporosi funzionalizzati con gruppi aldeidici. Questo enzima è il primo della serie enzimatica composta da FDH, F<sub>ald</sub>DH e ADH (Schema 1.1) che catalizza la reazione di conversione dell'anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) a metanolo (CH<sub>3</sub>OH). La scelta del supporto migliore e le prove di ottimizzazione dell'immobilizzazione e stabilità termica sono state studiate sfruttando la reazione spontanea dell'FDH di conversione del formiato di sodio (HCOONa) in anidride carbonica (CO<sub>2</sub>). Inoltre, è stata analizzata l'efficienza di conversione della CO<sub>2</sub> in acido formico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dell'FDH solubile e immobilizzato.

Sono stati utilizzati 5 supporti diversi classificabili in due categorie in base alla loro struttura: pori cilindrici ordinati spazialmente con una geometria esagonale, MSU-H e SBA-15, con diametro medio dei pori (D<sub>p</sub>) rispettivamente di 4 nm e 7 nm; struttura "spugnosa" formata da sfere interconnesse da pori di diametro medio (D<sub>p</sub>) dai 15 ai 25 nm (MSU-F, MCF 0.5 e MCF 0.75). È risultato che le rese di immobilizzazione maggiori sono state riscontrate per i supporti aventi D<sub>p</sub> di poco superiore al diametro dell'enzima (6 nm), come ad esempio per MSU-H che presenta un D<sub>p</sub> di 7 nm e una IY<sub>p</sub> dell'80%. Tuttavia, "l'efficienza" dell'FDH immobilizzato maggiore (UI<sub>mg</sub> = 1.01 μmol/min g) è stata riscontrata nel supporto avente D<sub>p</sub> maggiore, cioè MCF 0.75. Invece "l'efficienza" totale del supporto maggiore (UI<sub>g</sub> 1.44 μmol/min g) è stata riscontrata per l'MSU-F che presenta un D<sub>p</sub> minore di MCF 0.75, ma mostra degli aggregati di particelle di silice di dimensioni ridotte. Quindi è stato visto che la struttura, il D<sub>p</sub> e la grandezza degli agglomerati dei supporti silicei sono le caratteristiche più influenti per la resa di immobilizzazione e attività dell'enzima immobilizzato. Questo è dovuto a due principali fenomeni: limitazione di diffusione di substrato all'interno dei pori che risulta più marcata per i supporti con struttura dei pori cilindrica e per agglomerati di dimensione maggiore; irrigidimento eccessivo dell'enzima collocato nei pori del supporto, soprattutto per i pori di diametro minore.

Il supporto MCF 0.75 è stato selezionato per le prove successive in quanto presentava la più alta "efficienza" enzimatica (UI<sub>mg</sub> = 1.01 μmol/min g) e una buona "efficienza" globale (UI<sub>g</sub> 1.03 μmol/min g). Per la prova di ottimizzazione dell'immobilizzazione è stato visto che 5 mg di FDH su g di supporto era la quantità di proteina offerta (P<sub>0</sub>) migliore per la reazione di immobilizzazione. Quindi è stata valutata la stabilità termica a 50 °C del supporto MCF 0.75 con P<sub>0</sub> di 5 mg/g e si è visto che, dopo 24 h, questo conserva il 75% di attività contro il 35% dell'FDH solubile, grazie ai legami covalenti con il supporto. Infine, sono state condotte delle prove per valutare la capacità di conversione della CO<sub>2</sub> in acido formico dell'FDH solubile e immobilizzato (su MCF 0.75 con P<sub>0</sub> = 5 mg/g). È stato visto che le concentrazioni di acido formico finali risultavano molto basse, al massimo 15.2 ppm per l'FDH solubile e 7.3 ppm per l'FDH immobilizzato. La causa di questa scarsa attività è stata attribuita sia alla bassa concentrazione di CO<sub>2</sub> in soluzione e sia all'alta velocità di riconversione dell'acido formico in CO<sub>2</sub> da parte dell'enzima. Inoltre, è stato visto che l'FDH immobilizzato su MCF 0.75 mantiene il 70% di attività dopo 5 cicli di riutilizzo.

Questo lavoro può essere il punto di partenza per future ricerche basate su: lo studio di FDH più efficienti per la conversione di CO<sub>2</sub>; l'ottimizzazione di un supporto MCF-tipo in base al D<sub>p</sub> e alla grandezza e superficie degli agglomerati; l'immobilizzazione nello stesso supporto di FDH, F<sub>ald</sub>DH e ADH per la conversione di CO<sub>2</sub> in metanolo; la presenza di un sistema di rigenerazione del cofattore NADH/NAD<sup>+</sup>.

## Bibliografia

- [1]. Piumetti M., Bonelli B., Massiani P., Dzwigaj S., Rossetti I., Casale S., Armandi M., Thomas C., Garronea E. Effect of vanadium dispersion and of support properties on the catalytic activity of V-containing silicas. *Catalysis Today* 179. 2012, 140-148.
- [2]. S. Brunauer, L.S. Deming, W.E. Deming, E. Teller, On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases. *Journal of the American Chemical Society* 62. 1940, 1723–1732.
- [3]. Rouquerol J., Rouquerol F., Llewellyn P., Maurin G., Sing K. Chapter 13: Adsorption by Ordered Mesoporous Materials. *Adsorption by Powders and Porous Solids*. 2014. Elsevier. Marseille, Montpellier (Francia).
- [4]. Johansson E. M. *Controlling the Pore Size and Morphology of Mesoporous Silica*. Department of Physics, Chemistry and Biology (IFM), Linköping University. 2010.
- [5]. Bernal C., Urrutia P., Illanes A., Wilson L. Hierarchical meso-macroporous silica grafted with glyoxyl groups: opportunities for covalent immobilization of enzymes. *New biotechnology* 30. 2013, 500-506.
- [6]. Kim H., Jung J. C., Yeom S. H., Lee K., Yi J., Song I. K. Immobilization of a heteropolyacid catalyst on the aminopropyl-functionalized mesostructured cellular foam (MCF) silica. *Material research bulletin* 42. 2007, 2132–2142.
- [7]. Schmidt-Winkel P., Lukens Jr. W. W., Yang P., Margolese D. I., Lettow J. S., Microemulsion Templating of Siliceous Mesostructured Cellular Foams with Well-Defined Ultralarge Mesopores. *Chemistry of Materials* 12. 2000, 686-696.
- [8]. Piumetti M., Bonelli B., Armandi M., Gaberova L., Casale S., Massiani P., Garrone E., Vanadium-containing SBA-15 systems prepared by direct synthesis: Physico-chemical and catalytic properties in the decomposition of dichloromethane. *Microporous and Mesoporous Materials* 133. 2010, 36-44.
- [9]. Piumetti M., Bonelli B., Massiani P., Dzwigaj S., Rossetti I., Casale S., Gaberova L., Armandi M., Garrone E. Effect of vanadium dispersion and support properties on the catalytic activity of V-SBA-15 and V-MCF mesoporous materials prepared by direct synthesis. *Catalysis Today* 176. 2011, 458-464.
- [10]. Hussain M., Fino D., Russo N. N<sub>2</sub>O decomposition by mesoporous silica supported Rh catalysts. *Journal of Hazardous Materials* 211-212. 2012, 255-265
- [11]. Liu Y., Feng w., Li T., He H., Dai W., Huang W., Cao Y., Fan K. Structure and catalytic properties of vanadium oxide supported on mesocellulose silica foams (MCF) for the oxidative dehydrogenation of propane to propylene. *Journal of Catalysis* 239. 2006, 125-136.
- [12]. Hussain M., Fino D., Russo N. Modified KIT-6 and SBA-15-spherical supported metal catalysts for N<sub>2</sub>O decomposition. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1. 2013, 164-174.

- [13]. Bernal C., Sierra L., Mesa M. Improvement of thermal stability of B-galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macro-mesoporous silica. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 84. 2012, 166–172.
- [14]. Valle Gomes M. Z., Palmqvist A. Immobilization of formaldehyde dehydrogenase in tailored siliceous mesostructured cellular foams and evaluation of its activity for conversion of formate to formaldehyde. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 163. 2018, 41-46.
- [15]. Balistreri N., Gaboriaua D., Jolivalta C., Launaya F. Covalent immobilization of glucose oxidase on mesocellular silica foams: Characterization and stability towards temperature and organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 127. 2016, 26-33.
- [16]. Bolivar J. M., Wilson L., Ferrarotti S. A., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M., Mateo C. Stabilization of a Formate Dehydrogenase by Covalent Immobilization on Highly Activated Glyoxyl-Agarose Supports. *Biomacromolecules*. 7, 2006, 673-669.
- [17]. Bernal C., Guzman F., Illanes A., Wilson L. Selective and eco-friendly synthesis of lipoaminoacid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts. *Food Chemistry* 239. 2018, 189–195.
- [18]. Kim Y., Leeb S., Oh B. Enhancement of formic acid production from CO<sub>2</sub> in formate dehydrogenase reaction using nanoparticles. *RSC Advances* 6. 2016, , 109978.
- [19]. Choe H., Joo J. C., Cho D. H., Kim M. H., Lee S. H., Jung K. D., Kim Y. H. Efficient CO<sub>2</sub>-Reducing Activity of NAD-Dependent Formate Dehydrogenase from *Thiobacillus* sp. KNK65MA for Formate Production from CO Gas. *PLoS ONE* 9. 2014, 7-17.
- [20]. Nabavi Zadeh P. S., Valle Gomes M. Z., Åkerman B., Palmqvist A. Förster resonance energy transfer study of the improved biocatalytic conversion of CO<sub>2</sub> to formaldehyde by co-immobilization of enzymes in siliceous mesostructured cellular foams. *ACS Catalysis* 8. 2018, 7251-7260.
- [21]. Marpani F., Pinelo M., Meyer A. S. Enzymatic conversion of CO<sub>2</sub> to CH<sub>3</sub>OH via reverse dehydrogenase cascade biocatalysis: Quantitative comparison of efficiencies of immobilized enzyme systems. *Biochemical Engineering Journal* 127. 2017, 217-228.
- [22]. Obert R., Dave B. C. Enzymatic Conversion of Carbon Dioxide to Methanol: Enhanced Methanol Production in Silica Sol-Gel Matrices. *Journal of the American Chemical Society* 121. 1999, 12192-12193.
- [23]. Piumetti M., Hussain M., Fino D., Russo N. Mesoporous silica supported Rh catalysts for high concentration N<sub>2</sub>O decomposition. *Applied Catalysis B: Environmental* 165. 2015, 158–168

- [24]. Illanes A., Altamirano C., Wilson L. Chapter III: Homogeneous Enzyme Kinetics. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Valparaíso (Cile). Springer, 2008.