

# 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

## **Immobilizzazione di proteasi su biochar da lolla di riso**



### **Relatori**

prof.ssa Debora Fino  
prof.ssa Francesca Demichelis  
prof.ssa Silvia Fraterrigo Garofalo

**Candidato**

Alessio Margaira

Novembre 2023



# Indice

<b>1. Introduzione</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Biochar</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 ALCALASE®</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Materiali e metodi</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Preparazione soluzione enzimatica</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2 Produzione biochar</b> .....	<b>15</b>
2.2.1 Funzionalizzazione del biochar.....	16
<b>2.3 Funzionamento pHmetro</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4 Funzionamento spettrofotometro</b> .....	<b>18</b>
<b>2.5 Caratterizzazione biochar</b> .....	<b>20</b>
2.5.1 Analisi elementare CHNSO.....	20
2.5.2 Analisi FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) .....	21
2.5.3 Valutazione point of zero charge .....	22
2.5.4 Analisi BET .....	23
2.5.5 Spettroscopia FTIR-ATR.....	25
<b>2.6 Prove di immobilizzazione</b> .....	<b>27</b>
2.6.1 Retta di taratura enzima .....	28
2.6.2 Svolgimento prove di immobilizzazione .....	28
<b>2.7 Misura attività enzimatica</b> .....	<b>29</b>
2.7.1 Retta di taratura per attività enzimatica .....	30
2.7.2 Svolgimento prove per misura attività enzimatica.....	30
<b>3 Presentazione dei risultati</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1 Risultati caratterizzazione biochar</b> .....	<b>34</b>
3.1.1 Analisi elementare CHNSO.....	34
3.1.2 Analisi FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) .....	35
3.1.3 Valutazione point of zero charge .....	37
3.1.4 Analisi BET .....	38
3.1.5 Spettroscopia FTIR-ATR.....	39
<b>3.2 Prove di immobilizzazione</b> .....	<b>43</b>
3.2.1 Retta di taratura.....	43
3.2.2 Quantità enzima immobilizzato .....	45
<b>3.3 Risultati attività enzimatica</b> .....	<b>47</b>
3.3.1 Retta di taratura per attività enzimatica .....	47
3.3.2 Risultati attività enzimatica enzima diluito.....	48
3.3.3 Risultati attività enzimatica enzima immobilizzato .....	49
<b>4 Conclusioni</b> .....	<b>51</b>
<b>5 Riferimenti bibliografici</b> .....	<b>53</b>
<b>6 Indice delle figure, delle tabelle e dei grafici</b> .....	<b>56</b>



# 1. Introduzione

Negli ultimi anni si sono compresi a fondo i problemi e le criticità della produzione industriale legata alle economie lineari, esse originano grandi quantità di rifiuti e un massiccio consumo in termini di spesa energetica, spesso frutto delle poco efficienti procedure utilizzate nella trasformazione delle materie prime.

Le tecnologie più “obsolete” prevedono infatti l'estrazione di una risorsa, la sua lavorazione, così da ottenere un prodotto finito, l'utilizzo da parte dei consumatori e infine lo smaltimento dell'oggetto una volta che è cessata la sua utilità. Questo approccio genera diversi problemi tra cui, ad esempio, quello dell'ingente sfruttamento delle materie prime: nell'Unione Europea, infatti, se ne importano più di quante ne vengano esportate e questo fa sì che si crei una dipendenza da paesi esportatori delle stesse. Un'altra problematica legata alla produzione di materie prime e la loro produzione, infatti le tecnologie disponibili sono molto inquinanti (*è stato calcolato che la produzione dei materiali utilizzati ogni giorno per tutti i processi, industriali e non solo, sia responsabile del 45% delle emissioni di CO<sub>2</sub> [1]*). Infine, la crescita demografica genera un costante aumento nella domanda di prodotti, anche quando essi sono ottenuti mediante la trasformazione di risorse limitate.

Come alternativa a questo approccio produttivo, più tradizionale, si contrappone l'economia circolare.

L'idea alla base dell'economia circolare è quella di rendere i rifiuti di un determinato mercato o di una determinata lavorazione una risorsa per un altro impiego, il tutto minimizzando le spese energetiche ed economiche legate allo smaltimento dei rifiuti e all'approvvigionamento.

Recentemente è diventato un parere comune che sia necessario un cambiamento drastico nello stile di produzione industriale per poter mitigare gli effetti dei cambiamenti climatici già in atto, per garantire pari opportunità in tutte le aree del mondo e per massimizzare lo sfruttamento di ogni risorsa anche attraverso il riciclo e il riuso. Tutto ciò si può ottenere grazie all'impiego di nuove tecnologie che rendono i processi industriali più sostenibili e tenendo conto dei 17 obiettivi per lo sviluppo sostenibile dell'organizzazione delle nazioni unite. Questi ultimi sono descritti nell'Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile che è un programma d'azione per le persone, il pianeta e la prosperità sottoscritto nel settembre 2015 dai governi dei 193 Paesi membri dell'ONU [2].

Il presente lavoro di tesi descriverà le strategie per l'immobilizzazione di un enzima su supporti di origine organica, ottenuti attraverso la valorizzazione di una materia di scarto, per via dell'argomento trattato ritengo che possa essere compreso negli ambiti dell'obiettivo di sviluppo sostenibile numero 12 che ha come tematica “*Garantire modelli sostenibili di produzione e di consumo*”.

È necessario tenere conto di quante più tecnologie possibili descritte negli altri obiettivi e i contenuti degli stessi possono adattarsi a diversi contesti, non essendo focalizzati su una singola tematica, come ad esempio il tredicesimo che ha come finalità “*Promuovere azioni, a tutti i livelli, per combattere i cambiamenti climatici*”.

Le soluzioni sviluppate, sebbene siano studiate per ambiti anche molto distanti tra loro, hanno un unico scopo finale ossia quello di proporre dei metodi di produzione alternativi, più sostenibili.

Alcune tecniche emergenti dell'ingegneria chimica prevedono l'uso di supporti alternativi per catalizzatori, ad esempio, in questo studio, verrà utilizzato il biochar come alternativa al carbone attivo. Altri lavori prevedono l'uso di biocatalizzatori ed enzimi per eseguire estrazioni enzimatiche che permettono notevoli risparmi in termini energetici rispetto ai processi con solventi, infatti, gli enzimi utilizzati, in generale, non sopportano condizioni di processo troppo spinte in termini di temperature e pressioni poiché andrebbero incontro a denaturazione. Il campo di applicazione degli enzimi come biocatalizzatori è quindi energeticamente vantaggioso con un impatto positivo sull'economia del processo.

Un approccio più moderno della produzione industriale, inoltre, abbraccia quelle tecniche che puntano all'intensificazione di processo ovvero produrre in maniera più efficiente con l'obiettivo di aumentare le rese di produzione. Con questi presupposti, nell'ambito chimico e biochimico, si possono ottenere stesse quantità di prodotti in reattori di volumi inferiori e con un utilizzo inferiore di materie di partenza.

Nelle pagine seguenti saranno descritte alcune tecniche per l'immobilizzazione di un enzima del tipo proteasi che è noto con il nome commerciale ALCALASE®. Il supporto utilizzato, nell'ottica del riciclo di materie di scarto, è la lolla di riso, anche chiamata pulone, ovvero l'involucro rigido più esterno della cariosside. Connessi alla lavorazione degli scarti dell'industria del riso ci sono diversi problemi:

- Le polveri che si liberano dai trattamenti di pulizia della cariosside possono causare patologie nei soggetti che lavorano a loro stretto contatto. Le polveri con particelle di diametri superiori a 10 µm causano irritazioni nelle vie respiratorie.
- Le stesse polveri sono esplosive e quindi possono rappresentare un pericolo se accumulate in sufficienti quantità.

Nel lavoro di tesi che si andrà a presentare le procedure descritte saranno svolte a partire dalla lolla di riso, non saranno pertanto coinvolti processi a monte dell'ottenimento di essa non incorrendo così nelle problematiche sopra descritte.

La pianta del riso è coltivata in gran parte del mondo, ma la regione geografica che produce circa il 73% della produzione mondiale è l'Asia.

La lolla di riso conferisce alla cariosside protezione durante lo sviluppo e fino al momento della raccolta quando poi verrà separata. Al momento della raccolta la percentuale in peso attribuita ad essa si aggira tra il 20-30%, questo, unito ai grandi volumi produttivi di riso, fa sì che si generino quantità importanti di questo residuo organico (si stima che ogni anno ne venga prodotto più di 100 milioni di tonnellate dai trattamenti sul riso [3]). La presenza di cellulosa, lignina, carbone organico, silice amorfa (che costituisce la quasi totalità di elementi inorganici presenti nella lolla) e una bassa percentuale di umidità rendono la lolla di riso un'ottima base di partenza per processi che possano valorizzarla. Essa può infatti essere usata come combustibile, come additivo ai materiali di costruzione per le sue proprietà isolanti oppure come matrice da alimentare ai processi pirolitici. In alcuni studi la lolla è valorizzata estraendo da essa (e dalla paglia che si origina dalla produzione della pianta di riso) silice e cellulosa, l'estrazione è effettuata mediante trattamenti che prevedono l'esposizione a temperature di 90°C per un tempo prolungato delle materie prime a contatto con idrossido di sodio. Tali studi affermano che da queste materie prime i prodotti di interesse sono ottenuti con una buona resa [4].



Figura 1 Schema di reazione pirolizzatore

Una strategia nota per la valorizzazione del pulone è quella di sottoporlo a trattamenti pirolitici che saranno descritti nel dettaglio nel paragrafo sul biochar. Grazie ad essi è infatti possibile ottenere una serie di prodotti:

- Il prodotto in forma gassosa che si ottiene da questo processo è il *syngas* ovvero una miscela di  $H_2$  e  $CO$  con un elevato potere calorifico.
- Il prodotto solido ottenibile è il *char* che può essere utilizzato come supporto per catalizzatori ed enzimi (*biochar*) oppure utilizzato come combustibile per il suo elevato potere calorifico.
- Il prodotto liquido prende il nome di *tar* il quale può essere convertito in idrocarburi ad alto valore aggiunto mediante processi come il cracking catalitico o il cracking termico.

Un altro aspetto positivo della pirolisi è la bassa quantità di ceneri che si generano dal processo e una bassa emissione di inquinanti.

Saranno rese più chiare nella sezione dedicata le condizioni di processo necessarie per la pirolisi; tuttavia, si può accennare che son necessarie temperature elevate per lunghi tempi e questa è considerata una criticità per la sostenibilità del processo.

In alternativa la lolla di riso è valorizzata ottenendo prodotti contenenti silice per via del suo alto contenuto di silicio attraverso diversi metodi che prevedono trattamenti idrotermici, biologici, chimici o termochimici sulla matrice di partenza.

Il ruolo della lolla di riso in questo lavoro di tesi è quello di fornire un substrato organico di partenza per produrre biochar, sul quale sarà fissato un enzima. Questa pratica può essere utile per l'impiego di enzimi in processi estrattivi.

Una problematica comune nei processi estrattivi che impiegano enzimi al posto di solventi è il recupero degli stessi. Agendo come catalizzatori, infatti, il loro utilizzo può non essere limitato a un solo ciclo estrattivo, anzi, l'attività enzimatica è mantenuta. Inoltre l'enzima non recuperato può essere considerato come un inquinante e se viene utilizzato per l'estrazione di un alimento/integratore è necessario separarlo per non incorrere in situazioni indesiderate (come reazioni allergiche nei soggetti predisposti qualora lo ingeriscano). È quindi necessario recuperare agevolmente l'enzima per poterlo riutilizzare in una successiva estrazione e questo recupero è facilitato se le fasi di enzima e dell'ambiente nel quale esso reagisce sono differenti.

Sono riportate in letteratura diverse tecniche per l'immobilizzazione degli enzimi su diversi supporti, nel seguente lavoro di tesi sarà utilizzata l'immobilizzazione per contatto.

Dopo la descrizione dei metodi utilizzati per produrre il biochar a partire dalla materia di partenza, saranno descritti i metodi utilizzati per attivarlo e funzionalizzarlo, rendendolo così adatto allo scopo di renderlo un supporto efficiente. Successivamente saranno discussi i risultati delle analisi necessarie alla caratterizzazione del biochar e saranno illustrate le tecniche e i risultati per l'immobilizzazione. Si riportano di seguito alcune informazioni introduttive sul biochar e sull'alcalase.

## 1.1 Biochar

L'impiego del biochar come supporto per enzimi e catalizzatori è in forte crescita negli ultimi anni, questo è motivato dal fatto che, per far avvenire reazioni enzimatiche, occorre un supporto che mantenga l'enzima stabile e che ne renda facile la separazione una volta terminata la reazione. Quando gli enzimi non sono fissati su di un supporto le spese legate all'intero processo possono aumentare di molto, questo per via del fatto che il recupero dell'enzima dai prodotti, spesso in un'unica fase, non è molto agevole. Ciò si ripercuote sulla resa del processo che è inevitabilmente abbassata dalla presenza di enzima nel prodotto e sulla spesa per l'enzima che viene utilizzato una sola volta.

Il biochar ha le caratteristiche chimiche e morfologiche adatte per essere utilizzato come supporto per enzimi. Esse variano in base alla biomassa di partenza e ai pretrattamenti effettuati su di essa. Si può affermare con buona approssimazione che, sebbene il biochar venga prodotto da materie prime differenti, la sua composizione elementare è simile e l'elemento presente in maggior quantità è il carbonio, seguito da idrogeno, ossigeno e tracce di azoto e zolfo. Questo materiale ha tuttavia degli aspetti negativi legati al tipo di reazioni coinvolte nella sua produzione che fanno sì che in ambito industriale non sia molto diffusa la produzione né l'utilizzo: una delle criticità è legata alla sintesi del biochar; infatti, esso è prodotto attraverso processi termochimici dove avvengono reazioni endotermiche. Connesse a questo tipo di processi ci sono elevate spese energetiche, dovute alle alte temperature che sono raggiunte (in un range tra i 300 e 900°C) e che devono essere mantenute per lunghi periodi. Solitamente il tempo di reazione per la produzione di biochar può durare fino a qualche ora [5].

La produzione di biochar, specialmente in Italia, genera piccoli volumi poiché ad essa, come già descritto, è correlata un'ingente spesa energetica che causa un aumento nei costi, i quali sono alla base di una bassa domanda da parte degli utilizzatori. Sono sei le aziende sul suolo nazionale che producono biochar, nella totalità dei casi anche il syngas prodotto è valorizzato attraverso la produzione di energia elettrica o energia termica che soddisfa esigenze operative degli impianti oppure destinata al riscaldamento di acqua necessaria ad enti esterni. In Italia l'utilizzo principale del biochar prodotto è come ammendante agricolo per la grande quantità di carbonio contenuto al suo interno. Un altro impiego emergente è come fonte energetica (usato come biomassa) a basse emissioni. Al fine di produrre a livello industriale il biochar non sono ancora disponibili in Italia delle normative da seguire tuttavia possono essere rilasciati, da alcune associazioni del settore, alcuni "standard volontari" che certificano, valorizzandoli, i prodotti se fabbricati con processi industriali che rispettano determinate direttive. Gli standard volontari che si possono ottenere in Italia sono certificati dalla associazione italiana biochar (*ichar*) ed hanno valenza sul biochar destinato all'uso di ammendante agricolo/uso suolo. Ci sono poi altre certificazioni che hanno valenza a livello europeo. Gli standard danno direttive sulla biomassa di partenza, sulla definizione del biochar

e sul processo produttivo. Possono soddisfare i requisiti per ottenere lo standard volontario italiano i prodotti di pirolisi e gassificazione, ottenuti a partire da residui di origine vegetale da agricoltura e foresta.

Attraverso un decreto ministeriale dell'ottobre 2022 il biochar è stato inserito nella lista degli ammendanti per terreni in agricolture biologiche. Questo potrebbe far sì che la produzione di questo materiale susciti maggiore interesse e un conseguente aumento nelle quantità di biochar prodotte tuttavia questi provvedimenti legislativi, tendenzialmente, fanno riferimento al solo biochar destinato ad usi agricoli. Esistono poi delle direttive europee che danno chiare informazioni sulla composizione del biochar al fine di utilizzarlo come ammendante organico o come substrato di coltivazione. [6]

Si riporta di seguito lo schema di un tipico pirolizzatore industriale, nel presente lavoro di tesi il biochar utilizzato è stato prodotto mediante l'utilizzo di un reattore del Politecnico di Torino, su scala di laboratorio. Le procedure saranno descritte nel dettaglio successivamente.

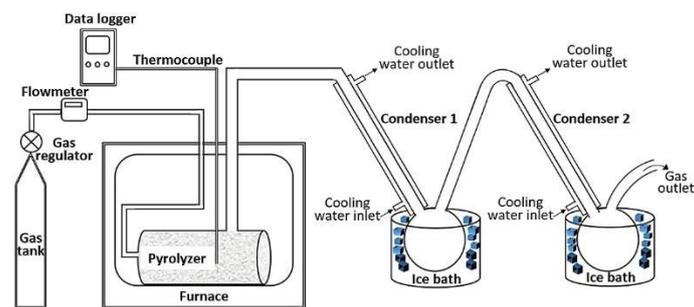


Figura 2 Tipica configurazione industriale per produzione biochar

Passando alla descrizione delle reazioni termochimiche attraverso le quali si produce biochar, esse hanno condizioni di processo comuni: assenza di ossigeno e alte temperature, queste, portano alla realizzazione del processo che prende il nome di *pirolisi* effettuato sulla matrice organica di partenza. In genere, in diversi intervalli di temperatura avvengono diverse reazioni: fino a 140°C avviene un allontanamento del vapore acqueo e si allontanano i composti organici volatili, per temperature comprese tra i 140 e 400°C avviene una degradazione dell'emicellulosa e si rompono i legami tra cellulosa e lignina. Tra 400 e 600°C avvengono le reazioni pirolitiche. Grazie alla pirolisi la cellulosa e la lignina presenti nella biomassa vengono quindi degradate attraverso un insieme di reazioni, tra le quali, le più comuni sono la depolimerizzazione e la frammentazione. Il biochar non è l'unico prodotto della pirolisi, anche un residuo liquido "tar o bio-oil" e uno gassoso "syngas" vengono prodotti durante questo processo.

La pirolisi è un processo termochimico che ha la peculiarità di avvenire in assenza totale di ossigeno. Per completezza nella presentazione si ritiene opportuno citare gli altri processi termochimici che possono portare alla produzione di biochar o che portano alla completa ossidazione della biomassa.

- *Gassificazione*: in questo processo avviene una ossidazione parziale attraverso una serie di passaggi (asciugatura, pirolisi, ossidazione/combustione e gassificazione), la porzione di char è prodotta nella fase di pirolisi a temperature tra i 150 e 400°C. La fase successiva consuma l'ossigeno che è fornito in quantità sub-stoichiometriche e parte dei prodotti di pirolisi. I composti carboniosi rimanenti sono infine resi gassosi attraverso l'uso di agenti come aria, vapore, ossigeno e anidride carbonica. In questo processo lo scopo finale è produrre quanto più syngas possibile, ciò giustifica la bassa resa in biochar che si aggira tra il 5-10% (è così bassa poiché si tratta di quanto resta in seguito alle reazioni di gassificazione che consumano lo stesso biochar). Il syngas

prodotto è costituito da gas come CO, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e altri idrocarburi a catena corta. Le matrici di partenza adatte a questo tipo di processi sono tutti i materiali contenenti carbonio come ad esempio: biomasse, carbone e materiali plastici.

- *Hydrothermal carbonization*: si tratta di un processo termochimico analogo ai precedenti, si differenzia da essi per la matrice di partenza che ha un livello di umidità superiore rispetto a quelle utilizzate nella pirolisi e nella gassificazione. L'acqua viene utilizzata come reagente e non va spesa energia per allontanarla a differenza dei due precedenti processi dove se l'umidità era superiore ad una certa soglia erano necessari dei pretrattamenti di essiccazione. Il prodotto di questo processo, per distinguerlo dai due precedenti, prende il nome di *hydrochar*. Un'altra differenza rispetto ai precedenti processi risiede nelle tecniche utilizzate per la reazione, la biomassa, più umida, è sottoposta in reattori chiusi ad un aumento di temperatura e pressione per mantenere liquida l'acqua presente. Le temperature che vengono raggiunte hanno un impatto sui prodotti originati nel reattore favorendone alcuni rispetto ad altri (ad alte temperature ossia per valori superiori a 400°C la produzione è indirizzata ad una maggiore quantità di prodotti gassosi).
- *Combustione*: avviene quando è fornita una quantità stechiometrica di ossigeno, è una reazione esotermica e i prodotti di reazione principali sono CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Le ceneri originate sono difficilmente valorizzabili.

Il processo di pirolisi, come altri processi termochimici, può essere indirizzato alla produzione in maggior quantità del prodotto che si vuole ottenere attraverso modifiche nelle condizioni di processo. In base alla matrice di partenza, alla temperatura di processo, alla velocità con la quale la temperatura di processo è raggiunta e al tempo di residenza nel reattore si possono ottenere alcuni prodotti in prevalenza di altri e possono essere "variate" le caratteristiche degli stessi. In linea di massima la resa in biochar decresce all'aumentare della resa in *syngas*, questa condizione si realizza quando si ha un brusco aumento di temperatura e le temperature di pirolisi sono alte. È stato osservato che per temperature intermedie di pirolisi, ovvero attorno ai 500°C [7], si ottiene una resa massima nella produzione di *tar* questo per via del fatto che, al di sopra di tale temperatura, avvengono reazioni di cracking termico che favoriscono la produzione di *syngas*.

In funzione dalla velocità di riscaldamento della biomassa, i processi pirolitici possono essere classificati come: pirolisi veloce, pirolisi lenta, flash pirolisi. Esistono delle fasi del processo che si svolgono indipendentemente dalla velocità di riscaldamento: una prima decomposizione termica, che porta alla formazione di un solido termicamente stabile e di alcuni liquidi, una seconda decomposizione dove avvengono rotture di molecole (cracking termico) e ricombinazioni al fine di convertire i composti organici instabili in prodotti gassosi.

Nella pirolisi veloce, il cui scopo è l'ottenimento di maggiori quantità di prodotti più volatili, il riscaldamento è dell'ordine di decine di °C/s mentre nella pirolisi lenta la crescita di temperatura è dell'ordine di decine di °C/min. Nei processi che eseguono una pirolisi lenta i prodotti volatili hanno un tempo di permanenza nel reattore maggiore, questo è connesso ad una crescita della resa in char. Gli effetti che ha la velocità di riscaldamento sul char si notano maggiormente a temperature di pirolisi più basse. Un passaggio che accomuna il trattamento di ogni biomassa trattata è l'inertizzazione con una corrente di N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>, quest'ultima è effettuata al fine di rimuovere l'ossigeno rimasto intrappolato nel reattore durante le fasi di montaggio che porterebbe ad un'ossidazione della materia organica a discapito della pirolisi, un indice di queste reazioni indesiderate è la presenza di composti gassosi del tipo NO<sub>x</sub> nei prodotti di reazione gassosi.

Come anticipato, un riscaldamento più brusco e una temperatura operativa più elevata (condizioni della pirolisi veloce) provocano una diminuzione nella resa di produzione di biochar ma il prodotto risultante avrà una maggiore superficie specifica e maggior contenuto in carbonio. Questo è motivato dal fatto che le condizioni sono adatte per far avvenire le reazioni di pirolisi secondarie. Una rapida volatilizzazione dei prodotti gassosi originati dal cracking termico può così portare ad un aumento della porosità del char. Si può orientare la produzione anche attraverso un controllo del tempo di residenza nel reattore dei prodotti gassosi. Nel caso della pirolisi veloce essi devono infatti essere raffreddati velocemente per evitare che le reazioni di cracking secondario possano avere inizio e massimizzare in questo modo la quantità di liquido prodotto a discapito del gas.

Le caratteristiche dei prodotti finali e la resa in biochar dipendono dalle condizioni di processo. Esempi delle caratteristiche legate al biochar che possono variare al cambiamento delle condizioni operative del processo sono: la superficie specifica, il volume e la dimensione dei pori, il contenuto di carbonio e ossigeno, il pH e la presenza di gruppi funzionali. Nel caso del pH si può osservare un aumento legato all'aumento della temperatura di pirolisi, questo è dovuto ad una diminuzione della presenza di gruppi funzionali organici come -COOH e -OH. Per quanto riguarda la dimensione dei pori si nota una correlazione con il tempo di residenza: si è notato un aumento dell'area dei pori del biochar con un aumento del tempo di permanenza nel reattore fino a 2h tempo oltre il quale si è osservata una rapida inversione di tendenza [7].

La composizione della materia di partenza influenza le caratteristiche del char che si viene a formare. La matrice più comune è costituita da biomassa lignocellulosica. Il tipo di materiale incide sul contenuto di carbonio presente nel char, nella capacità di accumulo di sostanze e nella quantità di ceneri prodotte. Anche la capacità di scambiare cationi dipende dal materiale grezzo di partenza.

Oltre alla materia prima di partenza, per causare modifiche nei parametri del biochar possono essere utilizzate altre tecniche. In questo modo si può ottenere un prodotto con caratteristiche ben definite, ricercate per il ruolo che esso dovrà ricoprire. Queste metodologie si dividono in attivazione di tipo fisico e chimico:

- Attivazione fisica: prevede l'uso di agenti come ad esempio il vapore, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> che modificano il char tramite azioni di tipo fisico. Nel caso del vapore esso è usato per sottoporre il biochar ad una gassificazione parziale che causa modifiche nella struttura chimica. In questo caso l'acqua agisce come reagente nelle reazioni che si originano, l'ossigeno fa sì che si liberino CO mentre l'idrogeno, reagendo con il carbonio, forma composti idrocarburici leggeri. Altro vapore (che agisce sempre come reagente) permette alle reazioni di procedere fin quando non si ottengono CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Essendo questi ultimi prodotti costituiti da molecole che si trovano allo stato gassoso, allontanandosi, originano porosità che causano un incremento della superficie specifica. I pori che si vengono a creare sono di dimensioni ridotte ma, in seguito ad una eventuale attivazione chimica, possono aumentare di dimensioni [5].
- Attivazione chimica: in questa operazione possono essere usati acidi e basi che causano alterazioni chimico-fisiche nella superficie del biochar, aumenta il numero di gruppi funzionali incrementando così la capacità del materiale di adsorbire. I trattamenti con acidi causano un aumento in gruppi funzionali contenenti ossigeno un aumento dell'idrofilia. I trattamenti con composti basici tendono ad aumentare l'apolarietà del char. Le basi più comuni per effettuare una attivazione chimica sono NaOH e KOH.

- Altri metodi prevedono l'utilizzo di UV e trattamenti magnetici, entrambi stanno riscontrando un notevole interesse poiché non utilizzano chemicals potenzialmente dannosi per l'ambiente e non tossici. Inoltre, nel caso dei trattamenti su materiali con proprietà magnetiche, si origina un supporto che sarà facilmente rimovibile dai prodotti al termine della reazione di interesse attraverso l'uso di un magnete.

L'utilizzo del biochar nel presente lavoro di tesi sarà come supporto per l'alcalase, un enzima del tipo proteasi. Per questo motivo si citano i meccanismi attraverso i quali può avvenire l'immobilizzazione che può essere di due tipi: attraverso un legame covalente, come avviene dopo la funzionalizzazione con glutaraldeide, oppure attraverso l'adsorbimento superficiale, dove le forze di attrazione sono quelle di Van der Waals. Quest'ultimo meccanismo è fortemente influenzato dalle caratteristiche superficiali del materiale che possono essere variate attraverso l'attivazione. Anche le tecniche di incapsulamento e intrappolamento possono essere utilizzate, tuttavia la maggior parte degli studi si concentra sulle prime due.

Al fine di migliorare le caratteristiche di questo materiale come supporto si può procedere anche con la funzionalizzazione, essa prevede l'utilizzo di sostanze chimiche per far sì che sulla superficie si leghino dei gruppi funzionali che consentano l'adesione degli enzimi posti a contatto con la matrice attraverso legami covalenti.

In conclusione, per quanto riguarda le possibili applicazioni di questo materiale in ambito industriale, si possono citare le soluzioni trovate in diversi studi. Al momento l'utilizzo del biochar su scala industriale è il settore dell'agricoltura dove viene impiegato come ammendante agricolo o supporto per colture. Altri impieghi possono essere:

- Come supporto per catalizzatori nella conversione dei composti aromatici presenti in gran quantità nel tar, anch'esso prodotto della pirolisi, per produrre H<sub>2</sub> e CO. Nello studio il char è stato confrontato con altri catalizzatori usati per impieghi simili come, ad esempio, quelli utilizzati nel processo di raffinazione del FCC. In questo tipo di reazioni di riduzione si è notata, per quanto riguarda l'utilizzo del char, una decrescita di prestazioni all'aumentare delle dimensioni particellari [8].
- Come catalizzatore nella produzione di biodiesel. Alla base di questo processo avvengono reazioni di transesterificazione o esterificazione e i reagenti sono acidi grassi e alcol mentre i prodotti sono acqua e biodiesel. È stato dimostrato che il biochar pretrattato con acido solforico e successivamente attivato con idrossido di potassio mostra una alta attività nell'esterificazione degli acidi grassi liberi [9].
- È stato studiato l'impiego del biochar come catalizzatore per la conversione catalitica selettiva a bassa temperatura degli inquinanti atmosferici NO<sub>x</sub> usando ammoniaca come composto riducente. Nello studio son stati usati un char attivato chimicamente e uno sottoposto ad una attivazione fisica. Son in seguito stati fatti i confronti sulle rese di reazione che hanno mostrato una maggiore conversione degli inquinanti nel caso del biochar attivato chimicamente [7].
- L'impiego come ammendante del suolo consente di neutralizzare l'acidità del terreno dove applicato e fissare il carbonio all'interno di esso. Attraverso questo impiego, oltre ad avere effetti positivi sulla qualità del suolo, si riducono le emissioni di CO<sub>2</sub> perché il C presente nella biomassa usata per la produzione di biochar attraverso la pirolisi viene accumulato nel terreno stesso. Attraverso la pirolisi si riesce a fissare il 50% del carbonio inizialmente presente nella biomassa all'interno del terreno a differenza della combustione dove solo il 3% viene fissato.

- Per completezza nell'elencare gli impieghi emergenti del biochar si cita la sua applicazione come supercondensatore e il suo impiego nelle celle a combustibile.

## 1.2 ALCALASE®

Il ruolo degli enzimi è quello di catalizzare le reazioni, analogamente ad un catalizzatore inorganico, grazie ad un abbassamento della barriera energetica di attivazione della reazione. Il loro uso consente un notevole incremento nella cinetica di reazione permettendo così alle reazioni di avvenire più velocemente sempre rispettando i “vincoli” imposti della termodinamica.

Le differenze principali tra i catalizzatori inorganici e gli enzimi risiedono nella struttura assunta dagli stessi durante il processo di catalisi della reazione e da cosa sono costituiti: i catalizzatori inorganici spesso sono costituiti da supporti porosi inorganici con una composizione chimica semplice (ad esempio allumina o silice) e da metalli nobili dispersi su di essi, non ci sono variazioni sostanziali della loro geometria in fase di reazione e il processo di catalisi avviene in seguito a diverse fasi che prevedono trasporti di materia dal bulk al sito attivo (e viceversa) e a fenomeni di adsorbimento della specie chimica che deve reagire sui siti attivi del catalizzatore stesso. Se paragonati agli enzimi, che possono anche essere chiamati catalizzatori organici o biocatalizzatori, i catalizzatori inorganici agiscono in maniera meno specifica sulle reazioni che catalizzano.

Gli enzimi sono costituiti da biomolecole di grandi dimensioni: sono proteine complesse ad alto peso molecolare da 12 a 1000kDa (ad eccezione dei ribozimi che sono costituiti da molecole di RNA), sono altamente specifici sulle reazioni che catalizzano e come prestazioni, tendenzialmente, sono più performanti dei catalizzatori inorganici a parità di substrato. L'origine degli enzimi è organica, infatti essi sono prodotti all'interno di organismi viventi per catalizzare le reazioni di catabolismo/anabolismo e altre reazioni necessarie alla sopravvivenza.

Essi sono stati classificati in 7 classi in base alle reazioni chimiche che catalizzano dall'ente *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*:

<b>Enzima</b>	<b>Ruolo</b>
Ossidoreduttasi	Catalizza le reazioni di ossidoriduzione, che coinvolgono scambi di elettroni (ad es. perossidasi).
Trasferasi	Catalizza il trasferimento di gruppi funzionali come il gruppo fosfato, amminico (ad es. N-acetiltransferasi).
Idrolasi	Catalizzano la scissione di una molecola mediante l'uso di acqua (ad es. Alcalase) .
Liasi	Catalizzano l'addizione o rimozione di un gruppo chimico (ad es. decarbossilasi).
Isomerasi	Catalizzano le reazioni di isomerizzazione (ad es. Serina racemasi).

Ligasi	Catalizzano la formazione di legami tra molecole (ad es. DNA-ligasi).
Traslocasi	Catalizzano il trasporto di biomolecole attraverso la membrana mitocondriale (ad es. ATP-ADP traslocasi).

Tabella 1 Classi di enzimi

Gli enzimi, per potere svolgere la loro funzione, devono possedere determinate caratteristiche geometriche. Piccole variazioni possono inattivare l'enzima pertanto è necessario mantenere la reazione catalizzata da enzimi in condizioni di pH e temperatura ottimali per lo stesso. Una temperatura troppo elevata può portare alla denaturazione irreversibile delle proteine che costituiscono l'enzima e una troppo bassa può rallentare la reazione. Il pH può causare delle modifiche nella conformazione del biocatalizzatore e renderlo inattivo. Ad ogni enzima sono associate delle condizioni operative ottimali che permettono di utilizzarlo nelle condizioni in cui la velocità della reazione catalizzata sia massima. Si può descrivere l'attività enzimatica con una curva "a campana" dove per determinati valori di temperatura e pH si ha un picco che corrisponde alle condizioni ottimali. Alcuni enzimi devono essere dotati di cofattori (ioni inorganici o complesse molecole organiche) o gruppi prostetici (ioni metallici o coenzimi) per poter catalizzare le reazioni. La sola parte proteica può essere identificata con il termine *apoenzima* mentre la combinazione attiva di apoenzima e cofattori è definita *oloenzima*. Generalmente l'azione dei gruppi prostetici e dei cofattori agisce sulla geometria dell'enzima, la loro assenza rende impossibile l'attacco tra enzima e substrato.

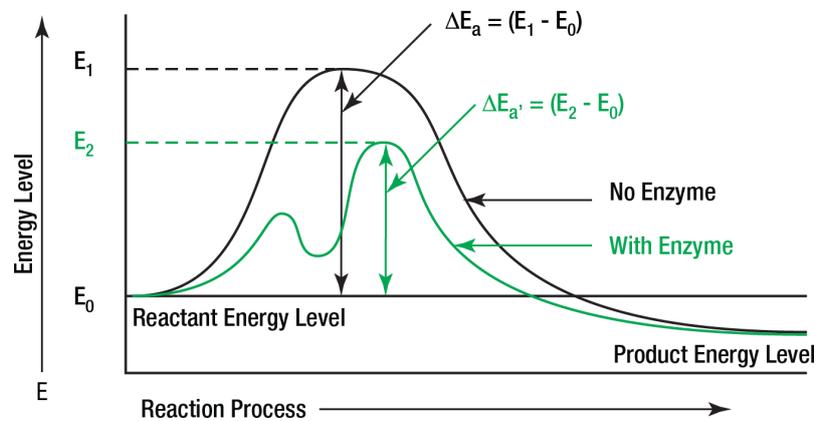


Figura 3 Andamento energia di attivazione di una reazione catalizzata

Come mostrato in figura, l'andamento dell'energia legata alla formazione di un prodotto in una reazione catalizzata e non catalizzata ha un andamento diverso (minore nel caso della reazione catalizzata da un enzima) si possono notare due picchi che corrispondono all'energia di attivazione dei complessi attivati enzima-substrato (ES) ed enzima-prodotto (EP). La formula che descrive le reazioni enzimatiche è la seguente:



Dove E = enzima, S = substrato, P = prodotto.

Le cinetiche che meglio approssimano l'andamento delle reazioni catalizzate da enzimi sono del tipo Michaelis-Menten, in questi casi si distinguono due condizioni che rappresentano i diversi regimi di reazione in base alla concentrazione più o meno elevata del substrato. La bassa presenza di substrato origina reazioni con una cinetica, sostanzialmente,

lineare (poiché l'enzima è presente in eccesso rispetto al substrato) mentre per elevati valori di substrato la cinetica è apparentemente di ordine zero (siccome tutto l'enzima presente si lega al substrato saturando così tutti i siti attivi disponibili).

Attualmente il modello che meglio descrive l'interazione tra enzima e substrato è l'*induced-fit model*, questo modello afferma che, per far sì che avvenga la reazione, sono necessarie delle modifiche nella geometria dell'enzima, del substrato o di entrambi. Questo consente la formazione di legami chimici deboli che legano enzima e substrato, i quali possono far sì che i legami indeboliti nei reagenti permettano alle reazioni di avvenire più rapidamente. Questo modello ha soppiantato il meno recente modello *chiave-serratura* dove si descrivevano le interazioni tra enzima e substrato come tra reagenti statici e che non cambiano la propria forma in seguito a interazioni.

Passando ad una descrizione delle caratteristiche che si devono garantire al fine di mantenere gli enzimi operativi con una buona attività conviene ricordare che essi sono catalizzatori di origine naturale, si sono sviluppati grazie alla capacità di adattamento e alle esigenze nell'organismo in cui operano. Queste caratteristiche possono rendere critico il loro impiego in ambito industriale, trovando come limite, ad esempio, il fatto che un eccesso di substrato inibisca la loro azione e che presentino una cinetica di saturazione.

Un'ulteriore problematica nell'utilizzo di enzimi, così come si trovano in natura, è la loro solubilità in acqua, ciò rende difficoltoso il loro recupero quando impiegati su substrati in fase liquida e causando quindi una diminuzione nella resa finale di prodotto e una contaminazione dello stesso che può avere effetti indesiderati. A questo aspetto si può rimediare fissando l'enzima su di un supporto solido. L'immobilizzazione può essere effettuata su un materiale poroso e in questo modo, una volta che l'enzima è fissato, si evitano reazioni intermolecolari tra enzimi e tra enzima e superfici esterne (come, ad esempio, bolle di gas o gocce di solvente). Esistono diverse tecniche di immobilizzazione e, in base alle caratteristiche del supporto, il recupero può essere più o meno semplice. Questa fase è comunque un presupposto fondamentale per l'utilizzo dell'enzima in maniera virtuosa; infatti, attraverso una immobilizzazione efficiente e un buon recupero lo stesso enzima può essere utilizzato in diverse configurazioni reattoristiche e controllando meglio il tempo di attività dell'enzima.

È molto importante che l'enzima, una volta immobilizzato, non perda la sua attività. In alcuni casi l'immobilizzazione può far sì che l'attività e la selettività dell'enzima aumenti; tuttavia, ciò può accadere solo in seguito ad uno studio approfondito sulle caratteristiche del supporto, dell'enzima e delle tecniche di immobilizzazione. È probabile che l'enzima utilizzato in fase liquida su un determinato substrato funzioni ma una volta immobilizzato su di un supporto non abbia più una mobilità sufficiente per ancorare il substrato e catalizzare la reazione, risultando inattivato. Ciò dipende dal tipo di enzima, dal substrato e dai legami che si vengono a creare, possono infatti crearsi dei legami di tipo secondario tra enzimi vicini causandone così l'inattivazione.

Tra i vantaggi dell'immobilizzazione di proteasi (di cui fa parte l'Alcalase, l'enzima utilizzato in questo studio) c'è un maggior controllo del grado di idrolisi delle proteine. L'unico modo, per questo tipo di controllo, è attraverso l'inattivazione enzimatica che avviene denaturando l'enzima esponendolo ad elevate temperature nel caso in cui esso non fosse fissato, avendo comunque dell'enzima inattivato nel prodotto. Avendo invece un enzima legato ad un supporto è possibile eseguire trattamenti in diverse condizioni (le condizioni ottimali per diversi enzimi) in seguito a filtrazioni (per rimuovere l'enzima che ha reagito fino a quel momento) tra i diversi intermedi di reazione. Attraverso uno studio della geometria dell'enzima e delle sue caratteristiche è possibile fissare l'enzima su di un supporto attraverso

una serie di legami, in questo modo l'enzima è dotato di una certa rigidità che gli permette di mantenere la propria attività anche in condizioni leggermente diverse dalle condizioni ottimali. In questo caso il legame tra supporto ed enzima si definisce *multi point covalent attachment* [10].

È importante anche l'orientazione dell'enzima fissato sul supporto, infatti, per proteine di notevoli dimensioni che devono essere idrolizzate, dev'essere precisa in una direzione, piccole variazioni porterebbero ad una inattivazione dell'enzima per i primi step dove il reagente è troppo voluminoso.

Nella scelta del materiale che funzionerà come supporto per l'Alcalase (in realtà questa considerazione può estendersi anche ad altre reazioni enzimatiche), va prestata attenzione alla dimensione dei pori: essi, infatti, devono permettere il passaggio dell'enzima che andrà a fissarsi sui siti attivi del supporto ma anche delle proteine che si desidera idrolizzare. Tendenzialmente, per via dell'ingombro delle proteine da trattare a inizio reazione, la velocità della reazione di idrolisi tende a crescere nel tempo poiché a partire da peptidi grandi se ne ottengono di più piccoli, i quali si muovono più agevolmente nei pori.

Esistono diverse soluzioni per fissare l'Alcalase, si riportano alcune di esse storicamente impiegate. Una di esse è l'immobilizzazione su agarosio, su silice, su una matrice *glass sol-gel* più *tetrametossisilano* ma anche su particelle con proprietà magnetiche come, ad esempio, particelle di chitosano rivestite.

Attraverso lo studio di tali strategie di immobilizzazione, son possibili soluzioni ancora più ambiziose, combinando enzimi diversi su uno stesso supporto è possibile fare avvenire più di una reazione contemporaneamente. Ciò richiede una approfondita conoscenza delle cinetiche enzimatiche e delle condizioni "di funzionamento" dell'enzima.

L'enzima utilizzato per l'immobilizzazione nel seguente lavoro di tesi è stato il *Bacillus Licheniformis*, identificato con il nome commerciale Alcalase®.

La scelta del supporto solido deve essere guidata dalle caratteristiche desiderate dello stesso, tra le quali un'elevata porosità e una serie di gruppi attivi presenti sulla superficie del materiale che permettano all'enzima di fissarsi. Nello studio la scelta è ricaduta su biochar prodotto a partire dalla lolla di riso.

Si riportano di seguito alcune informazioni sull'enzima che sarà utilizzato nello studio:

L'Alcalase è un enzima che fa parte delle proteasi, ovvero catalizza l'idrolisi del legame peptidico. Questo enzima ha dimostrato di essere uno dei più efficienti per quanto riguarda il rilascio di peptidi bioattivi, ossia catene di pochi amminoacidi che possono avere un ruolo in termini di attività biologica dei consumatori. Gli enzimi che catalizzano il taglio del legame peptidico prendono il nome di proteasi e si distinguono in due classi principali: le endoproteasi e le esoproteasi, in base a dove si colloca il legame peptidico che viene tagliato. La differenza in base a questi tipi di enzimi ha conseguenze anche nei prodotti finali; infatti, i primi generano polipeptidi di dimensioni maggiori, inoltre le endoproteasi trovano un range di applicazione più ampio e possono avere una sensibilità maggiore.

Nello specifico l'Alcalase agisce come endoproteasi che ha come sito d'attacco l'amminoacido *serina*. Inizialmente questo enzima veniva prodotto dal *bacillus subtilis*, al giorno d'oggi è prodotto dall'azienda Novozymes attraverso una fermentazione di *bacillus licheniformis* sommersi in reattori di tipo fed batch. Questo enzima lavora con un'elevata attività e stabilità a pH alcalini.

L'Alcalase, come molti altri enzimi che lavorano in ambiente basico, negli anni 60 ha trovato un vasto impiego nell'industria dei detersivi, utilizzato nella formulazione di

detersivi in polvere e liquidi che operano in condizioni di basicità per la rimozione di macchie di “origine” proteica. Un aspetto che ha reso comune l’impiego delle proteasi nell’industria della pulizia è la loro ridotta attività nei confronti delle proteine contenute all’interno di fibre costituenti i vestiti (ad esempio le proteine contenute nella lana e nella seta). Conoscendo maggiormente le potenzialità di questo enzima, a partire dagli anni 70, è utilizzato nell’industria alimentare per la produzione di proteine idrolizzate.

L’enzima che è stato utilizzato in sede di laboratorio nel lavoro di tesi è l’Alcalase che è prodotto dalla azienda sopra citata. È il prodotto commerciale a prendere il nome di Alcalase® ed è costituito da un liquido contenente 50% (w/w) glicerolo, 41% (w/w) acqua e 9% (w/w) di estratto di proteasi da *Bacillus licheniformis* [10].

L’attività dell’enzima che si trova in commercio è indicata in Anson Units, in questo caso il valore è  $\geq 2.4$  U/g.

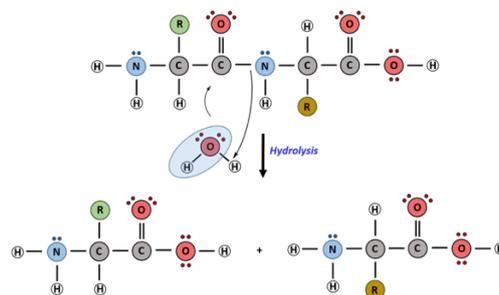


Figura 4 Idrolisi legame peptidico

L’Alcalase catalizza il taglio del legame peptidico preferibilmente se l’amminoacido, il cui legame peptidico impegnava il gruppo carbossile (quindi la molecola a sinistra nella Fig. 3), ha gruppo R grande e privo di carica. Anche i gruppi R degli amminoacidi adiacenti a quelli dove avviene il taglio hanno un certo ruolo (avviene con più facilità se sono gruppi idrofobici), in questo modo l’idrolisi del legame origina peptidi che generalmente hanno caratteristiche idrofobiche.

Per via della grande quantità che l’enzima può usare come punto di ancoraggio, l’azione di esso origina un idrolizzato costituito da tanti peptidi di piccola dimensione e permette all’enzima di agire in un vasto campo applicativo.

Secondo la compagnia che produce l’enzima, le condizioni ottimali si trovano a pH 10 e l’attività massima a 70°C. Il range di pH nel quale l’enzima può lavorare a  $T_{amb}$  è tra 5 e 11 con una decrescita rapida a pH più bassi. L’enzima è stabile in medium organici, in genere si può affermare che è tanto più stabile quanto più decresce la polarità del solvente [10].

Da queste informazioni emerge la potenzialità di questo enzima per soddisfare svariate esigenze. Si è deciso di approfondire e riportare, in particolare, l’estrazione di polipeptidi bioattivi da diverse sorgenti mediante l’estrazione enzimatica. Questi processi si differenziano, tra le altre cose, dalle materie prime di partenza e dalle condizioni di processo. In alcuni studi sono riportati dei confronti tra le estrazioni che avvengono mediante il solo utilizzo dell’Alcalase o il suo utilizzo in parte del processo oppure in processi in cui non è utilizzata e l’estrazione avviene diversamente, per avere un mezzo di paragone.

Gli esempi riportati di seguito, sono di particolare interesse in particolare per l’industria della nutraceutica e degli integratori alimentari, sono infatti riportati i metodi per ottenere, attraverso l’idrolisi enzimatica operata dall’Alcalase dei polipeptidi con caratteristiche antiossidanti.

Substrati di partenza di origine vegetale per l'ottenimento di prodotti di interesse possono essere i semi di soia, il mais, i ceci, il riso, il pisello e molti altri.

Per quanto riguarda il trattamento di scarti dell'industria del pesce, l'Alcalase può rivelarsi un'ottima alternativa ai trattamenti tradizionali, molto energivori poiché richiedono elevate temperature e l'utilizzo di grossi macchinari. L'estrazione enzimatica può essere effettuata su materie di scarto che, nel caso dell'industria ittica, possono raggiungere fino al 50% in peso del valore iniziale del pescato [10]. L'ottenimento di peptidi bioattivi utilizzabili nell'industria farmaceutica è inoltre utile per ridurre le materie prime da smaltire che in questo settore sono in grandi quantità. Per ottenere questo genere di prodotti, solitamente, la parte più usata è la pelle del pesce. Oltre all'ottenimento di peptidi bioattivi si può ottenere anche dell'olio ricco in acidi grassi polinsaturi, tipicamente a partire da organi che contengono molto olio come, ad esempio, il fegato e altri organi interni. Anche questo prodotto può trovare un ampio impiego nell'industria degli integratori e in quella farmaceutica. Per via dell'importanza di questa applicazione si possono trovare in letteratura diversi studi. Si riportano alcune informazioni dello studio di Yi Liu e Deepika Dave [11] dove viene utilizzato lo stesso enzima dello studio descritto ed è fissato su un supporto funzionalizzato con glutaraldeide. Il supporto è costituito da particelle di chitosano ricoperte da ossido di ferro per rendere più agevole il recupero. È riportato inoltre che l'enzima può essere riutilizzato fino a tre volte (in tre estrazioni differenti) e le condizioni di idrolisi migliori si trovano per un tempo di contatto di 1h a 65°C. Il substrato di partenza dello studio citato è il salmone dell'atlantico e la resa estrattiva di olio mediante l'enzima immobilizzato (20,55%) è paragonabile a quella dell'enzima in fase liquida. Nello studio è inoltre riportato che l'industria del salmone genera scarti compresi tra il 40 e 50% in peso della materia iniziale, questo giustifica l'interesse nel valorizzarli. Attraverso l'impiego di enzimi per l'estrazione di olio di pesce, in questo caso, c'è un notevole risparmio energetico poiché le strategie tradizionalmente usate impiegano temperature elevate (90-100°C) mentre con l'impiego di enzimi immobilizzati le temperature massime si aggirano intorno a 65°C poiché non è necessario l'aumento fino a 80°C per l'inattivazione enzimatica.

Altri impieghi dell'Alcalase si possono trovare nell'ambito dell'idrolisi delle proteine contenute nel siero del latte, della caseina ma anche delle proteine contenute nel plasma sanguineo e nelle uova. In molti di queste estrazioni sono necessari dei trattamenti di downstream che consentano una purificazione dei prodotti senza danneggiarli.

Si riporta inoltre che l'Alcalase, come altri enzimi, può essere utilizzata in combinazione con enzimi differenti ottenendo così un effetto sinergico nelle reazioni biochimiche da catalizzare. Questa combinazione può avvenire in seguito alla co-immobilizzazione ovvero all'immobilizzazione di differenti enzimi, in condizioni simili, sullo stesso supporto. L'effetto che si desidera ottenere con la co-immobilizzazione di enzimi è una serie di reazioni dove i prodotti della reazione tra substrato e un determinato enzima servano come reagenti in una reazione successiva con l'altro enzima immobilizzato sul supporto. Si ottengono così prodotti attraverso reazioni bio-catalizzate in due step ma in un'unica fase di reazione, non occorre pertanto eseguire una separazione al termine di ogni passo della reazione ma un'unica separazione finale è sufficiente. Un altro aspetto positivo nella co-immobilizzazione è la quasi totale eliminazione della fase lag grazie all'impiego di enzimi che sono in grado di operare con diversi substrati. In alcuni casi si possono notare degli aspetti positivi quali la realizzazione di una serie di reazioni che possono essere assimilate ad una "catena metabolica".

## 2. Materiali e metodi

### 2.1 Preparazione soluzione enzimatica

Per utilizzare l'enzima nelle prove di immobilizzazione dello studio descritto è stato necessario diluirlo in un buffer carbonato 5mM pH10. La scelta del valore di tale buffer è stata guidata dalle condizioni ottimali per l'immobilizzazione, è infatti necessario che il valore di pH usato nelle prove di immobilizzazione sia superiore al valore di carica complessiva nulla del supporto (che dipende a sua volta dal pH della soluzione in cui è immerso). Questa diluizione è stata resa necessaria del fatto di dover ricondurre i valori di concentrazione in un range misurabile dallo spettrofotometro.

La soluzione con l'enzima è costituita da 0,12 ml di enzima fornito dall'azienda produttrice e 49,88 ml di buffer carbonato con concentrazione 5mM a pH10 (corrispondente ad una diluizione di circa 1:417). Esso è stato ottenuto sciogliendo in 1l di acqua distillata 193,811mg di  $\text{NaHCO}_3$  e 285,4mg di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Il pH è stato regolato attraverso l'utilizzo del pHmetro, di una soluzione 0,1M di NaOH e una soluzione 0,1M di HCl.

### 2.2 Produzione biochar

Nel presente lavoro, il biochar utilizzato è stato prodotto attraverso una pirolisi lenta ossia con un incremento di temperatura di  $15^\circ\text{C}/\text{min}$  e una temperatura di reazione pari a  $600^\circ\text{C}$ . Con questo tipo di pirolisi, un riscaldamento più graduale permette alle reazioni di ripolimerizzazione di avvenire favorendo la resa in char a discapito dei prodotti liquidi e gassosi.

Il reattore disponibile presso il laboratorio BLUNOX del Politecnico di Torino è riscaldato attraverso l'uso di una resistenza elettrica, esso è contenuto in un guscio coibentato, allo stesso è connesso un condensatore costituito da uno scambiatore di calore a tubi coassiali il cui caricamento di acqua avviene in maniera discontinua. Il ruolo di quest'ultimo è abbassare la temperatura dei composti volatili e condensare l'olio presente nelle correnti in uscita dal reattore separandolo in questo modo dal gas prodotto. Il reattore, una volta caricato, viene riscaldato attraverso l'uso di resistenze elettriche e l'andamento della temperatura è monitorato attraverso l'uso di due termocoppie. È necessario poter controllare con precisione la velocità di riscaldamento della matrice organica da trattare e i tempi e temperature necessari per far avvenire le reazioni. Questo compito è affidato al programma di controllo del reattore. Le maggiori differenze in fase di processo sono connesse alle temperature di reazione, ai tempi di reazione e alla velocità di riscaldamento.

Il processo produttivo adottato è stato di tipo discontinuo, si è infatti adeguatamente ripulita l'apparecchiatura dai residui di biochar e tar presenti dal processo precedente come primo passo (il tar, essendo molto viscoso e non idrosolubile, è stato rimosso con etilacetato e la procedura ha richiesto un certo tempo perché si è ripetuta 5 volte) successivamente si è riempito il reattore con la nuova matrice organica, infine, è stata fatta avvenire la reazione.

Come passaggio preliminare, prima di dare avvio al riscaldamento della biomassa, si procede eseguendo un'inertizzazione della stessa inviando una corrente di gas inerte. Nello studio si è usata una corrente di azoto ma anche anidride carbonica o argon potevano essere utilizzati a questo scopo.

Una fase necessaria nell'apparecchiatura utilizzata, prima del recupero dei prodotti, è il raffreddamento della stessa. Si deve attendere un certo tempo per poter maneggiare il reattore

e recuperare i prodotti in quanto esso viene esposto ad elevate temperature e risulta complicato maneggiarlo poco dopo il termine della reazione.

Si riporta di seguito uno schema dove sono descritti brevemente i vari step per ottenere biochar attivati. Tale procedura è stata eseguita sul biochar nello studio descritto.

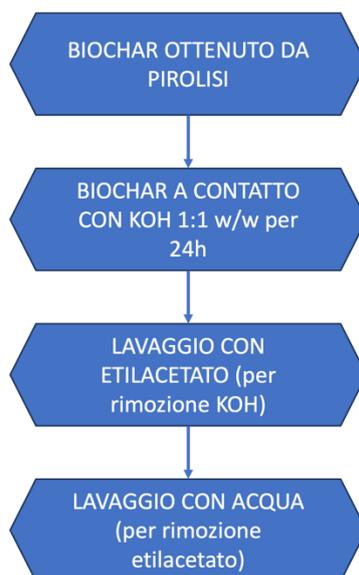


Figura 5 Procedura attivazione biochar

### 2.2.1 Funzionalizzazione del biochar

Come passaggio successivo all'attivazione è stata eseguita la funzionalizzazione del supporto. Per quantificare l'effetto della funzionalizzazione, dell'attivazione del supporto e dell'effetto sinergico dei due trattamenti sullo stesso supporto si è attivato chimicamente parte del biochar prodotto e successivamente si è funzionalizzato sia il supporto attivato che il non attivato. Nel presente lavoro la funzionalizzazione è stata eseguita in due step: il primo con una soluzione di etilendiammina e il secondo con glutaraldeide. Per ancorare la glutaraldeide sul supporto è infatti necessario che sulla sua superficie siano presenti dei gruppi amminici. Alcuni gruppi carichi restano sulla superficie dopo la funzionalizzazione, questo causerà interazioni di tipo ionico in un primo momento che avvicinano l'enzima alla superficie carica e successivamente si originano legami covalenti tra glutaraldeide legata ed enzima.

La funzionalizzazione è stata effettuata agitando per 3h il biochar e biochar attivato (500mg) con 20ml di soluzione 150mM di etilendiammina in acqua. Il passaggio successivo è stato un lavaggio con acqua in centrifuga a 5000rpm per 10 minuti ripetuto due volte. Successivamente si è agitato il biochar e biochar attivato in 25ml di soluzione 50mM di glutaraldeide per 1 ora. Al termine è stato effettuato un lavaggio con buffer fosfato pH 7 in centrifuga a 5000rpm per 10 minuti, anch'esso ripetuto due volte. Dopo ogni step è stata prelevata una certa quantità in vista delle analisi FTIR-ATR.

Al termine della funzionalizzazione è stato necessario asciugare il biochar, l'asciugatura è avvenuta lasciando a temperatura ambiente il campione, permettendo così l'evaporazione dell'acqua.

Il biochar non cambia aspetto in seguito alla funzionalizzazione o all'attivazione e si presenta come una polvere fine di colore nero. Esso è stato sminuzzato rendendolo polveroso

attraverso l'uso di un mortaio per aumentare la superficie di contatto del biochar durante i trattamenti



Figura 6 Aspetto biochar non attivato

### 2.3 Funzionamento pHmetro

Il pHmetro è un'apparecchiatura di laboratorio il cui ruolo è misurare il valore di pH di soluzioni liquide, è stato necessario il suo impiego nel seguente lavoro, nello specifico sono state effettuate accurate misurazioni in fase di misurazione del *point of zero charge* e nella preparazione dei buffer necessari per le prove di immobilizzazione. Un valore eccessivamente alto o basso del pH rispetto al valore ottimale può comportare la denaturazione dell'enzima rendendolo inattivo in maniera irreversibile.

Il pHmetro utilizzato è il modello *pH80+ DHS XS instrument* che si trova nel laboratorio BLUNOX del Politecnico di Torino. Si illustra di seguito il funzionamento di una generica apparecchiatura di questo tipo.



Figura 7 pHmetro utilizzato nelle misure

Il pHmetro misura l'acidità/basicità di una soluzione liquida attraverso la misura della concentrazione degli ioni  $H^+$  presenti. Maggiore è la quantità degli ioni  $H^+$  nella soluzione e maggiore è l'acidità della soluzione stessa. I valori di pH variano su una scala da 0 (sostanze acide) a 14 (sostanze basiche). Al valore di pH pari a 7 si ha una soluzione neutra. L'apparecchiatura è costituita da una sonda che invia un segnale elettrico al pHmetro, quest'ultimo fornirà, a partire dal segnale, un valore di pH.

Il funzionamento di tale apparecchiatura si basa sullo scambio ionico tra la soluzione da misurare e la soluzione all'interno della membrana vetrosa costituente l'elettrodo di riferimento. Questo scambio ionico genera una differenza di potenziale i cui valori sono correlati a diverse concentrazioni di ioni  $H^+$ . Tipicamente gli elettrodi sono fatti di vetro perché parte della manutenzione ordinaria al fine di mantenere correttamente operativa questa apparecchiatura sta nell'assicurare l'idratazione necessaria alla sonda in modo che non si degradi. La membrana vetrosa in una sonda a una soluzione buffer che permette agli ioni idrogeno di attraversarla. La differenza che si viene a creare genera la differenza di potenziale. Al fine di ottenere misurazioni affidabili il pHmetro va calibrato di tanto in tanto e tra una misurazione e l'altra la sonda va ripulita con acqua distillata. Alla fine delle misurazioni, tra un utilizzo e il successivo, la sonda va mantenuta idratata grazie all'utilizzo di un apposito coperchio riempito con una soluzione specifica.

L'alternativa all'utilizzo del pHmetro è l'impiego di cartine indicatrici di pH, questo metodo fornisce però risultati meno precisi e l'interpretazione dei risultati è tanto più accurata quanto più l'operatore è competente, questo poiché la misura è effettuata confrontando il colore assunto dalla cartina bagnata con la soluzione da misurare con una scala che associa alla colorazione un determinato valore di pH [12].

## *2.4 Funzionamento spettrofotometro*

La spettrofotometria UV-visibile è una tecnica analitica molto utilizzata in diversi studi per via della rapidità con cui fornisce risultati riguardanti le concentrazioni delle soluzioni esaminate. I valori misurati di assorbanza sono forniti dal confronto tra la quantità di luce ad una determinata lunghezza d'onda che viene assorbita o trasmessa da un campione esaminato, ed un valore di riferimento (bianco). I valori di assorbanza dipendono dalla concentrazione del campione esaminato, un valore alto di assorbanza indica un'alta concentrazione nel campione della sostanza esaminata. Nel presente caso studio questa tecnica è stata utilizzata per la misura di concentrazione di proteine e amminoacidi.

Lo strumento utilizzato per queste misure è lo spettrofotometro. In base all'azienda costruttrice lo strumento può avere caratteristiche costruttive leggermente diverse, tuttavia, alcuni componenti base sono sempre presenti in questo tipo di apparecchiature. Una parte del macchinario è la sorgente luminosa, in grado di emettere luce in maniera stabile in un grande range di lunghezze d'onda. Tipicamente le lampade utilizzate sono alogene, al tungsteno o allo Xenon. Un altro elemento sempre presente è il selettore di lunghezza d'onda dove attraverso dei filtri o un monocromatore si selezionano solo alcune lunghezze d'onda. In seguito al passaggio nel selettore di lunghezza d'onda, il fascio luminoso passa attraverso il liquido da esaminare che viene raccolto in apposite cuvette con delle superfici lisce e trasparenti. Tipicamente, prima di effettuare le misure, si tara lo strumento con un campione che non contiene il materiale da quantificare ma solo un solvente simile a quello utilizzato per la stessa prova. In questo studio, infatti, lo strumento è stato tarato utilizzando solo il buffer carbonato e il reagente di Bradford in vista delle misurazioni della concentrazione di proteine (a loro volta diluite nel buffer carbonato). Dopo il passaggio del fascio luminoso attraverso la

cuvetta il raggio luminoso giunge ad un detector per convertire la luce in un segnale elettrico. Generalmente i detector son costituiti da semiconduttori. Infine, il segnale elettrico viene processato da un computer e giunge all'utilizzatore finale.

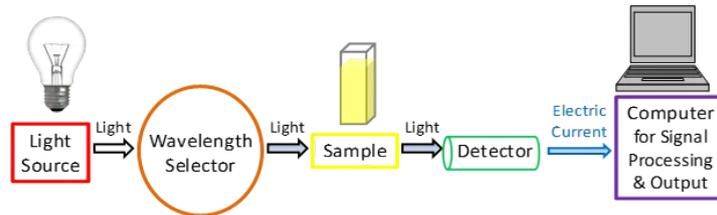


Figura 8 Schema funzionamento spettrofotometro

Il valore di assorbanza calcolato è il risultato di calcoli sulle grandezze coinvolte nella misurazione ed è direttamente proporzionale alla concentrazione del componente da misurare. Esso, infatti, è calcolabile attraverso la legge di Lambert-Beer oppure grazie al logaritmo in base 10 del rapporto tra i valori di intensità della luce  $I_0$  (prima che essa attraversi il campione) e  $I$  (dopo che è passata attraverso il campione). L'inverso de rapporto tra i valori di intensità prende il nome di trasmittanza e indica quanta luce passa attraverso un campione. Per ricondursi ai valori di concentrazione attraverso la legge di Lambert-Beer è necessario conoscere il valore di assorbanza (che sarà misurato attraverso l'impiego dello spettrofotometro), il cammino ottico e il coefficiente di assorbimento molare. Il valore di assorbanza è adimensionato.

$$A = \epsilon L c = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right) = \log_{10} \left( \frac{1}{T} \right) = -\log_{10}(T)$$

Figura 9 Equazioni per il calcolo dell'assorbanza [13]

Le considerazioni sulla concentrazione sono state fatte mediante l'uso di una retta di taratura dove ad un valore noto di concentrazione (calcolato conoscendo la concentrazione della soluzione madre e il fattore di diluizione utilizzato nella preparazione del campione) è associato un valore di assorbanza misurato. Noti più punti si può trovare una correlazione lineare tra diversi valori di concentrazione e assorbanza. Una volta trovata l'equazione della retta interpolante sarà pertanto possibile calcolare i valori di concentrazione a partire dal valore di assorbanza misurato. Per ottenere risultati affidabili è necessario che le misure dell'assorbanza ricadano nell'intervallo dei valori misurati in fase di costruzione della retta di taratura, inoltre lo strumento stesso ha un intervallo al di fuori del quale le misurazioni possono mostrare una maggiore incertezza. Può essere pertanto necessario ricorrere a delle diluizioni per rientrare nel range in cui le misurazioni sono affidabili e successivamente, conoscendo il valore di assorbanza e il fattore di diluizione, risalire al valore da misurare [13].

Per le misurazioni effettuate con lo spettrofotometro nello studio è stato utilizzato il modello *DR 5000 Hach Lange UV-vis Spectrophotometer* visibile nell'immagine di seguito.



Figura 10 Spettrofotometro usato per le misurazion

## 2.5 Caratterizzazione biochar

Al fine di comprendere se il biochar utilizzato ha le caratteristiche di: porosità, gruppi funzionali, composizione elementare e *point of zero charge* adatti al ruolo nel quale verrà impiegato, vanno effettuate delle analisi su di esso con l'uso di diverse tecniche e diversi strumenti che saranno descritti di seguito. Queste analisi permettono inoltre di comprendere se i pretrattamenti per eseguire l'attivazione chimica del biochar oppure i trattamenti per funzionalizzarlo abbiano effetti sulla presenza di diversi gruppi funzionali. Si dovranno notare infatti delle differenze nei risultati delle prove di caratterizzazione.

### 2.5.1 Analisi elementare CHNSO

Attraverso l'uso dell'apparecchiatura *Elemental analysis equipment vario MACRO cube* presente nel laboratorio FERMAN del DISAT al Politecnico di Torino è stata misurata la composizione del biochar e del biochar attivato con KOH (entrambi ottenuti sotto corrente di CO<sub>2</sub>), in termini qualitativi e quantitativi (questi ultimi espressi in percentuale).

L'analizzatore è composto da un forno che opera alla temperatura di 1050°C dove avviene l'ossidazione del campione. Il crogiolo sul quale sono ossidati i campioni è costituito da quarzo e ceramica, successivamente i vapori passano attraverso un letto di bolle di corindone e lana di quarzo per poi essere immessi nella colonna di riduzione costituita da pellet di rame, questa serve per rimuovere l'ossigeno che può essere rimasto nel flusso di gas in seguito alla combustione. In uscita dalla colonna di riduzione sono disposte le trappole dove avverrà l'effettiva misura degli elementi costituenti il materiale da analizzare. È necessario un carrier con il ruolo di movimentare i gas e vapori originati dalla combustione ma che non alteri i risultati delle analisi; pertanto, all'apparecchiatura va fornito elio in continuazione in fase di analisi, alimentato attraverso il collegamento ad una bombola. È necessario che i composti presenti nella corrente gassosa siano completamente ossidati per poter poi essere catturati dalle trappole costituenti la colonna cromatografica e poter in questo modo misurare la composizione, pertanto, la combustione deve avvenire in maniera completa, ciò si realizza anche aggiungendo sostanze che contribuiscono a far avvenire una completa combustione.



Figura 11 Immagine della postazione analizzatore elementare

Per la misura dell'ossigeno presente mediante l'utilizzo di questo macchinario, andrebbero cambiate le trappole, tipicamente questa operazione non viene effettuata e la misurazione di questo elemento è pertanto effettuata per differenza tra partire il valore iniziale e i valori misurati degli altri componenti sfruttando il bilancio di massa totale.

I materiali da analizzare sono disposti in campioni preparati seguendo una procedura ben precisa. Si preleva una sottile lamina di stagno di dimensioni circa 3x3cm, si forma un cono in modo che il contenuto non fuoriesca e si riempie questo cono con la materia da

analizzare (circa 20mg) e una quantità circa uguale di ossido di tungsteno che avrà il ruolo di aiutare la combustione. In seguito al riempimento, il contenitore di stagno è stato chiuso e pressato in modo da ottenere una compressa con una determinata forma, adatta al bruciatore.

Per il controllo dell'apparecchiatura e la raccolta dei dati ottenuti dall'analisi è necessario un computer con un software installato. Dal software sono fornite le posizioni dell'analizzatore nel quale vanno disposti i campioni da analizzare e l'analisi, una volta disposti i campioni negli alloggiamenti assegnati e avviata l'apparecchiatura, avviene in maniera automatizzata.

È necessario, prima di effettuare le prime prove successive a lavori di manutenzione, eseguire una taratura dello strumento con dei campioni contenenti solo ossido di tungsteno e verificare che la colonna di riduzione sia ancora in condizioni adatte al corretto funzionamento (un indice del fatto che il rame è troppo ossidato per funzionare in maniera corretta è la sua colorazione, questa ispezione dipende dalla sensibilità dell'esaminatore). Per la corretta riuscita dell'analisi vanno inoltre riportate con precisione le quantità di materiale analizzate.

### 2.5.2 Analisi FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy)

Questo tipo di indagine microscopica permette di osservare la morfologia superficiale dei campioni che saranno usati come supporto. Il microscopio FESEM utilizzato si trova nel laboratorio FESEM del DISAT al Politecnico di Torino, il modello è Zeiss SUPRA 40.

Attraverso questa indagine microscopica è possibile ottenere immagini nitide, in bianco e nero, con un ingrandimento tra 12x e 900000x, con una buona profondità di campo. Il portacampioni in questo microscopio può ospitare 9 campioni di area pari a 1cm<sup>2</sup>. I vantaggi della tecnologia a scansione elettronica sono molteplici, essa è versatile, non distruttiva e permette di ottenere informazioni anche sulla composizione di molti materiali.

Nel FESEM viene aumentata l'intensità degli elettroni emessi da una sorgente, mediante il passaggio attraverso un campo generato da un elettromagnete (il voltaggio per l'accelerazione varia da 0,1 a 30 kV). Dopo aver inviato il fascio elettronico sul campione, gli elettroni secondari che si liberano vengono raccolti da un detector che, in base alla loro intensità, genererà un'immagine. Gli elettroni secondari forniscono informazioni sulla topografia con un'elevata definizione.

L'apparecchiatura utilizzata è dotata inoltre di un detector per raggi X legati alla dispersione energetica, in grado di misurare la composizione del campione solido fornendo una analisi chimica, si può creare in questo modo una mappa della composizione.

Per funzionare è necessario che nell'apparecchiatura sia raggiunto un alto grado di vuoto ( $10^{-7}$  Pa nei pressi della *gun* per indirizzare gli elettroni).

L'emettitore di elettroni è l'elemento che differenzia il SEM dal FESEM. Esistono due tipi di sorgenti di elettroni: l'emissione termoionica dove sono originati da una sorgente costituita da filamenti di tungsteno, un problema legato a questa soluzione è l'evaporazione del materiale al catodo. L'alternativa è ricorrere a una *field emission gun* dove il filamento non è scaldato ma sottoposto a un gradiente di potenziale molto grande.

La definizione che si può raggiungere con un FESEM è  $< 2\text{nm}$  che rappresenta un miglioramento di 3/6 volte la definizione del SEM [14].

### 2.5.3 Valutazione point of zero charge

Il *point of zero charge* (*pzc*) rappresenta il valore di pH della soluzione nella quale è immerso il materiale adsorbente che rende nulla la carica superficiale su di esso. Ciò non significa che non sia presente alcuna carica sul supporto ma che le cariche superficiali positive e negative si bilanciano perfettamente. Il *pzc* dipende dalla temperatura, pressione e composizione della fase acquosa alla quale è valutato ma anche dal materiale che è utilizzato. Il *pzc* è forse uno dei parametri più importanti per quanto riguarda i processi di adsorbimento superficiale in quanto una superficie la cui somma delle cariche è neutra non sarà in grado di originare interazioni di tipo elettrostatiche.

In base al valore di pH della soluzione nel quale il biochar è esposto, si avranno dissociazioni di diversi gruppi superficiali dello stesso. Ad un aumento di pH della soluzione corrisponde un passaggio nella stessa di più ioni  $H^+$  dalla superficie, rendendo così la superficie negativa. Viceversa, se il pH della soluzione diminuisce, allora più ioni  $OH^-$  si dissocieranno rendendo la superficie carica positivamente. Questi fenomeni prendono il nome, rispettivamente, di dissociazione acida e dissociazione basica. Da queste considerazioni si può quindi affermare che per valori di pH inferiori al *pzc* saranno attratti composti anionici sulla superficie del materiale adsorbente mentre per pH superiori ad essere attratti saranno i composti con carica positiva, ovvero composti che hanno comportamento cationico [15].

La valutazione di questo parametro è importante perché fornisce sostanziali informazioni circa l'adsorbimento di molecole poiché per un supporto organico non è possibile conoscere con precisione quali siano tutti i siti attivi presenti sul supporto, i quali determinano la carica superficiale complessiva.

Molti processi possono interessare una generica superficie per originare la carica su di essa. Sono riportati i fenomeni principali che possono far sì che essa sia carica, non necessariamente avvengono tutti:

- Ionizzazione di gruppi superficiali (ad esempio se la superficie contiene gruppi acidi la dissociazione di essi può originare una carica negativa sulla superficie, avviene il contrario con gruppi basici sulla superficie, la prova per la misura del *pzc* variando il pH interessa questi ioni).
- Inclusione o solubilizzazione differenziale di ioni in un cristallo ionico (questo fenomeno non avviene nel caso del biochar).
- Accumulo/perdita di elettroni.
- Intrappolamento fisico di cariche nella fase solida (viene sostituito un atomo del reticolo che costituisce il materiale solido, avviene perlopiù in allumino-silicati, pertanto, non sarà un fenomeno rilevante nel caso del biochar).
- Adsorbimento specifico di ioni

Il *pzc* coincide con punto isoelettrico se non c'è adsorbimento di altri ioni rispetto ai *potential determining ions* come  $H^+$  e  $OH^-$  poiché in queste condizioni di pH, se la particella è sottoposta all'azione di un campo elettrico, essa non sarà mossa dalle forze generate da esso, avendo cariche complessivamente nulle. Nel caso in cui siano presenti specifici ioni che sono adsorbiti sulla superficie, questi parametri assumono valori leggermente diversi.

La conoscenza del punto di carica nulla consente di avere informazioni sull'attrazione e repulsione di molecole nei confronti del supporto. Per la valutazione del *pzc* sono stati utilizzati due materiali diversi, il carbone attivo e il biochar. La metodologia per la valutazione prevede l'incubazione per 48h del materiale da esaminare in soluzioni a pH noti.

Sono stati preparati 4 becher con 25 ml di soluzione a pH crescente da 6 a 12, regolando il pH con aggiunta di HCl e NaOH in una soluzione madre di NaCl 0,01M che serve come ponte salino. Alla soluzione son stati aggiunti 0,1g di materiale da esaminare.

L'incubazione è avvenuta in un'apparecchiatura presente nel laboratorio FERMAN del DISAT al Politecnico di Torino, dove i campioni son stati agitati per 48h a 60 rpm ad una temperatura di 25°C.

In questa prova il carbone attivo è servito come riferimento, mentre il biochar da rice husk ottenuto sotto corrente di N<sub>2</sub> è il materiale che si desidera analizzare.

#### 2.5.4 Analisi BET

Questa analisi ha la finalità di quantificare la superficie specifica e la distribuzione della dimensione dei pori del materiale che andremo ad utilizzare come supporto. Si basa sul principio di adsorbimento di un gas inerte (tipicamente è utilizzato l'azoto) sulla superficie del campione da analizzare. Il risultato delle analisi è dato in m<sup>2</sup>/g. La procedura per la misura è regolamentata dalla norma internazionale ISO 9277 [16]. Le informazioni ottenute da questo tipo di analisi sono molto importanti in quanto sono responsabili di come il materiale si comporta nell'ambiente circostante, nello specifico nelle prove di adsorbimento superficiale in quanto direttamente influenzato dalla porosità del materiale.

L'analisi è svolta in diversi step. Il primo step è il pre-condizionamento del materiale da analizzare. È necessaria una piccola quantità di campione per ottenere valori attendibili dalle analisi (circa 0,5 o 1g). Per preparare il campione è necessario rimuovere tutte le impurità dalla sua superficie, inclusa l'umidità. Questo passaggio è svolto mantenendo il materiale ad un'alta temperatura (qualche centinaio di gradi) in condizioni di vuoto per un tempo superiore alle 5 ore ed eventualmente sottoponendolo ad una corrente di gas inerte come elio o argon. Questa operazione prende il nome di degassaggio. Prima dell'analisi BET vera e propria alcuni macchinari hanno bisogno di una calibrazione con l'impiego di elio in una prova "vuota" ovvero senza campione.

L'analisi vera e propria inizia con un raffreddamento a temperature criogeniche del campione da esaminare, attraverso l'utilizzo di azoto liquido e in condizioni di vuoto spinto. La quantità di azoto inviato sul campione è monitorata e controllata costantemente e l'azoto è il gas tipicamente più usato per le misure di adsorbimento, tuttavia, anche altri gas come il kripton e l'argon possono essere impiegati a questo scopo, l'importante è che non si formino legami troppo forti tra gas adsorbito e supporto e che il gas possa essere desorbito alla stessa temperatura dell'adsorbimento. L'azoto è il gas più utilizzato per questa analisi poiché facilmente reperibile, tuttavia, la sua orientazione può avvenire in diversi modi che causano incertezze nella misura, le quali dipendono dalle caratteristiche superficiali del materiale da analizzare. Dopo ogni incremento di azoto inviato sul campione è lasciato un tempo sufficiente a permettere al sistema di raggiungere nuovamente l'equilibrio in termini di pressione parziale e successivamente viene misurato l'azoto adsorbito (quantità in massa). Le pressioni raggiunte in questa fase della misura sono sempre inferiori alla pressione atmosferica. Questa fase del processo avviene a temperatura costante che varia al variare del gas impiegato, nel caso dell'azoto liquido la temperatura dell'isoterma è 77K.

L'equazione di BET (Brunauer–Emmett–Teller) descrive una curva di tipo lineare sul grafico che ha come ordinate i parametri  $1/((P_0/P)-1)$  e come ascisse  $P/P_0$  (dove  $P/P_0$  è la pressione relativa). Per molti solidi, questa equazione, descrive una parte limitata della regione delle isoterme di adsorbimento. Attraverso l'uso di questo grafico si può ricavare la quantità di azoto (in massa) necessaria a formare uno strato che ricopre la superficie del

campione, chiamato *monolayer*. La superficie specifica totale del campione può essere infine calcolata dall'intercetta tra la curva nel grafico citato sopra e l'intercetta legata all'equazione BET e conoscendo l'estensione superficiale della sezione di una molecola d'azoto.

In base al gas adsorbito usato per le analisi e al materiale da esaminare l'adsorbimento sarà di diversa intensità.

Per determinare la sezione dei pori e la distribuzione della dimensione dei pori è necessario incrementare la pressione di gas adsorbito fino a quando i pori non sono completamente riempiti di azoto che a quel punto avrà ricoperto il materiale con un monolayer. Successivamente la pressione del gas viene ridotta in maniera controllata consentendo così al gas che si era condensato di evaporare, in una atmosfera inizialmente priva di azoto e l'azoto che evapora nuovamente viene costantemente controllato per creare l'isoterma di desorbimento. Dalle caratteristiche delle isoterme di adsorbimento e desorbimento si può risalire a informazioni riguardanti le dimensioni dei pori e la loro distribuzione. Essi si dividono in tre gruppi in base alla loro dimensione: micropori (<2nm), mesopori (2-50nm) e macropori (>50nm). Informazioni sulla superficie specifica sono ricavate dalla quantità di azoto desorbita dal campione esaminato. Una limitazione di questa analisi è legata al fatto che se i pori non sono accessibili dalla superficie essi non contribuiranno al calcolo della superficie specifica poiché non sono raggiunti dal gas.

Questa procedura si basa sull'estensione della teoria di Langmuir che mette in relazione un monolayer di gas adsorbito su una superficie con la pressione parziale di un gas ad una determinata temperatura. La teoria di Langmuir si basa sulle assunzioni che seguono:

- Tutti i siti che adsorbono presenti sulla superficie hanno uguale energia di adsorbimento nei confronti del gas che viene adsorbito. Il sito di adsorbimento è definito come l'area del campione dove la molecola si può adsorbire.
- L'adsorbimento di una molecola su un determinato sito avviene in maniera indipendente da adsorbimenti su siti vicini.
- L'attività dell'adsorbato è direttamente proporzionale alla sua concentrazione.
- Il gas adsorbito formerà un monolayer (unico strato di molecole adsorbite).
- Ogni sito attivo può essere occupato da una sola molecola.

La teoria di Langmuir si limitava a descrivere un adsorbimento che avviene attraverso la formazione di un monolayer, questo non è sempre vero, pertanto, la teoria BET ha introdotto altre tre condizioni:

- Le molecole di gas possono adsorbirsi su un solido in più layer.
- I diversi layer di adsorbimento non interagiscono.
- La teoria può applicarsi a ogni layer.

L'apparecchiatura utilizzata per questa analisi si trova nel laboratorio BLUNOX del DISAT al Politecnico di Torino ed è il modello *Micrometrics TRISTAR II*.

Per la descrizione del funzionamento e dell'apparecchiatura si è fatto riferimento agli articoli [17],[18] e [19].

Sono riportate di seguito le immagini dell'apparecchiatura e lo schema di funzionamento della stessa.

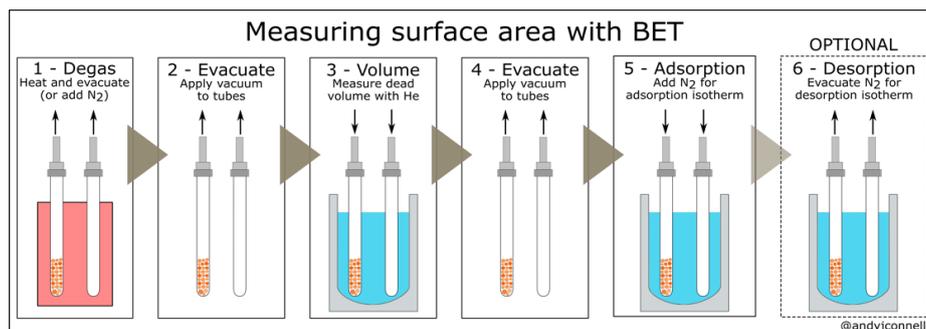


Figura 12 Schema funzionamento BET



Figura 13 Apparechiatura utilizzata per BET

### 2.5.5 Spettroscopia FTIR-ATR

La presenza nel supporto organico di gruppi funzionali può essere identificata dalla spettroscopia infrarossa. Questa tecnica di analisi non è distruttiva, in più la velocità con la quale si esegue e il costo relativamente contenuto delle apparecchiature l'hanno resa una delle tecniche più utilizzate nelle analisi di chimica organica. Essa sfrutta lo studio della risposta della materia una volta investita da un fascio di radiazioni elettromagnetico.

Quando le molecole sono investite da radiazioni con lunghezza d'onda nel campo degli infrarossi, aumenta l'ampiezza delle vibrazioni/rotazioni delle stesse. L'effetto che le onde hanno sulle molecole è univoco tra una determinata lunghezza d'onda e il tipo di molecola. Proprio grazie a tale caratteristica se nello spettro che si ottiene è presente un picco ad una certa frequenza, allora sarà presente il gruppo funzionale che, in corrispondenza di quella frequenza, vibra/ruota.

Lo spettro che si origina da questo tipo di analisi può essere considerato in due parti, la prima, sulla sinistra, da informazioni sui gruppi funzionali presenti nella molecola, la parte più a destra da invece informazioni aggiuntive sulla molecola, i picchi in questa zona sono più complessi da interpretare poiché frutto della combinazione di diversi modi vibrazionali.

Nell'analisi degli spettri si può notare che la frequenza di vibrazione di un legame è direttamente proporzionale alla forza dello stesso e inversamente proporzionale alla massa degli atomi che sono connessi attraverso ad esso è buona norma, inoltre, prestare attenzione alla parte con il più forte assorbimento (nello specifico ai picchi con piccola lunghezza d'onda, sulla sinistra dello spettro). L'assenza di determinati picchi può significare, con una certa accuratezza, l'assenza di alcuni gruppi funzionali nella molecola. La frequenza è alta nel caso dei legami C-H, O-H per via dell'atomo di H (leggero) se comparata a C-C o C-O. In

alcuni casi, per via della elevata massa degli atomi, si esce dal range degli infrarossi (come nel caso di legame con Br o I). Le frequenze di vibrazione dei doppi legami sono più alte rispetto ai legami singoli tra gli stessi atomi, ciò accade anche per i tripli legami.

Il macchinario in grado di misurare lo spettro IR del materiale da analizzare va inizialmente tarato (si misura il bianco senza campione).

È necessaria un'adeguata pulizia del piatto sul quale si posa il campione tra prove consecutive, con l'uso di alcol etilico.

Il funzionamento di tale macchinario si basa sul principio della riflettanza attenuata totale (per questo si identifica con la sigla ATR). Un fascio di radiazioni nel campo degli IR investe il campione che è pressato da un cristallo (tipicamente in Ge), parte dei raggi IR vengono assorbiti o attenuati e sono rimbalzati verso il cristallo, in questo mezzo i raggi sono nuovamente inviati alla materia da analizzare senza modifiche (in termini di assorbimento), questo si ripete fin quando la radiazione non raggiunge la fine del cristallo; dopo alcune riflessioni si ha un'attenuazione sufficiente per essere rilevata. Il materiale da esaminare è quindi investito più volte dalla radiazione IR e al termine, dalla radiazione risultante, si possono fare delle considerazioni sulla composizione del materiale. È riportata di seguito un'immagine per descrivere il concetto di riflettanza totale del raggio IR.

La misurazione avviene mediante uno specchio che riflette il raggio e lo invia ai rilevatori.

L'apparecchiatura utilizzata si trova nel laboratorio BLUNOX del DISAT al Politecnico di Torino ed è il modello *BRUNKER Tensor 27*.

Per questo motivo si ottengono spettri molto simili anche per campioni di diverse dimensioni dello stesso materiale. Queste peculiarità hanno reso questo strumento molto utilizzato. Si riesce in questo modo a capire quali sono i legami tra gli atomi ma non il loro numero e la loro presenza. Un altro motivo che ha reso di comune impiego questo macchinario è la possibilità di fare delle analisi senza la necessità di pretrattare il campione se composto da materiale solido. Sono riportate di seguito due immagini, la figura 13 al fine di descrivere il concetto della riflettanza totale e la figura 14 rappresenta l'apparecchiatura attraverso la quale sono state svolte le analisi.

Ogni spettro ottenuto dal biochar può suddividersi, in linea di massima, in quattro zone in base al tipo di gruppi funzionali che contiene: La prima è tra  $3700$  e  $2500\text{ cm}^{-1}$  ed è il gruppo associato alla presenza del gruppo funzionale  $\text{-OH}$ . Il secondo gruppo va da  $2500$  a  $2000\text{ cm}^{-1}$  e i picchi in questa regione sono associati alla presenza di gruppi funzionali con più di un singolo legame all'interno di catene carboniose. Per lunghezze d'onda più basse, ovvero tra  $1700$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$ , sono presenti picchi nel caso in cui siano presenti gruppi  $\text{C=O}$ , oppure avvenga lo stretching di anelli aromatici e lignina. Il gruppo finale, compreso tra  $1500$  e  $500\text{ cm}^{-1}$ , mostra picchi caratteristici nel caso in cui sia presente la cellulosa (picco a  $1095\text{ cm}^{-1}$ ) e alcuni alcheni la cui presenza è confermata dall'assenza di picchi alle lunghezze d'onda  $675$  e  $995\text{ cm}^{-1}$ .

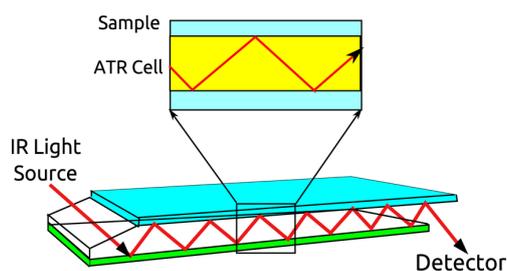


Figura 14 Principio di funzionamento riflettanza totale



Figura 15 Immagine apparecchiatura spettroscopia IR

Si riportano di seguito gli spettri del materiale di partenza (lolla di riso RH), del biochar (BC) e biochar ottenuto con NaOH (BC NaOH). In questo caso il biochar è stato attivato con l'idrossido di sodio invece che con l'idrossido di potassio tuttavia non si osservano, anche in base a confronti effettuati con studi da letteratura, notevoli differenze. Se infatti il lavaggio effettuato dopo l'attivazione è effettuato in maniera opportuna si noteranno differenze simili tra il campione non attivato e quello attivato. Gli spettri sono riportati su grafici nei quali le ascisse indicano la frequenza dell'onda incidente sul campione e in ordinata il valore percentuale di trasmittanza (100% corrisponde ad assenza di assorbimento mentre 0% ad assorbimento totale).

Si valutano nella sezione di discussione dei risultati le differenze tra gli spettri dei materiali non trattati e funzionalizzati. La funzionalizzazione è stata effettuata dapprima con etilendiammina e successivamente con glutaraldeide.

## 2.6 Prove di immobilizzazione

Le prove di immobilizzazione sono state effettuate nel laboratorio FERMAN del DISAT al Politecnico di Torino.

Come analisi preliminare è stato necessario valutare a quale pH svolgere l'immobilizzazione. Questo parametro è molto importante perché da esso dipende il comportamento elettrostatico dell'enzima (attraverso il punto isoelettrico della proteina) e del supporto (attraverso il *pzc* dei biochar). Dopo alcune valutazioni si è optato per un pH del buffer, ovvero la soluzione tampone nel quale viene diluito l'enzima e la proteina albumina in fase di costruzione della retta di taratura, pari a 10.

Un'altra apparecchiatura che è stata utilizzata in questa fase dell'esperimento per quantificare le proteine immobilizzate sul supporto è lo spettrofotometro, è stato utilizzato il modello *DR 5000 Hach Lange UV-vis Spectrophotometer* presente nel laboratorio FERMAN.

Il valore di pH, come visto, di importanza rilevante ai fini dell'ottenimento di buoni risultati, è stato misurato mediante il pHmetro presente nel laboratorio *BLUNOX pH80+ DHS XS instrument*.

Avendo riconosciuto l'importanza di questi valori si è deciso di riportare di seguito la descrizione del funzionamento di tali apparecchiature che permettono di ottenere le condizioni ottimali per le prove sperimentali e successivamente di quantificare i risultati.

### 2.6.1 Retta di taratura enzima

Per poter analizzare i risultati delle prove di immobilizzazione che richiedono una quantificazione delle proteine presenti nella soluzione buffer è stata necessaria la costruzione di una retta di taratura. Essa è stata ottenuta mediante l'utilizzo di una proteina disponibile ad un alto grado di purezza e che fosse utilizzabile in seguito alla dissoluzione nel buffer di una determinata quantità pesata. L'albumina è stata scelta a questo scopo in tali prove.

In un primo momento si è costruita la retta di taratura utilizzando un buffer adatto alle condizioni della proteina utilizzata per la costruzione della stessa, ovvero l'albumina. Pertanto, si è preparata una soluzione con concentrazione 0,5mg/ml di albumina in buffer fosfato (pH=7 e concentrazione 0,025M). Nello specifico in 0,5l di acqua son stati sciolti 0,677g di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 0,928g di  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , in seguito il pH è stato regolato con aggiunta di HCl e NaOH.

A questo punto, attraverso diluizioni che hanno reso la concentrazione della proteina via via decrescente, si sono ottenuti campioni con una diversa concentrazione di proteine. I valori di concentrazione di singoli campioni sono noti e sono stati calcolati sulla base dei volumi utilizzati nella diluizione e grazie al valore di concentrazione iniziale calcolabile con un semplice rapporto tra la massa di proteina utilizzata e il volume di buffer utilizzato. Successivamente è stato eseguito il saggio di Bratford sui campioni a concentrazione decrescente.

Il saggio di Bratford è stato eseguito nel laboratorio FERMAN e ha previsto l'utilizzo del reagente di Bratford e dello spettrofotometro *DR 5000 Hach Lange UV-vis Spectrophotometer* è stato necessario attendere una decina di minuti dopo aver agitato il contenuto delle cuvette costituito da 200 $\mu$ l di campione da analizzare e 2ml reagente di Bratford.

La lunghezza d'onda per valutare l'assorbanza è stata 595nm. Prima di ottenere i valori di assorbanza dei campioni con le proteine, si è tarato lo strumento settando il bianco su un campione contenente solo 200 $\mu$ l di buffer e 2ml di reagente di Bratford.

Come anticipato, la retta di taratura permette di quantificare i risultati delle prove. Attraverso l'utilizzo dello spettrofotometro, in seguito alla misura alla stessa lunghezza d'onda utilizzata in fase di costruzione della retta di taratura, si ottiene un valore di assorbanza, il quale, una volta inserito nell'equazione inversa della retta di taratura permetterà di ottenere un valore di concentrazione. È possibile utilizzare una proteina "standard" che in questo caso è stata l'albumina per ottenere risultati affidabili nello studio delle concentrazioni di altre proteine, in tale studio, infatti, la retta di taratura costruita attraverso diluizioni decrescenti di albumina ha permesso di ottenere risultati di concentrazioni di Alcalase. È necessario in ogni caso conoscere i parametri caratteristici della retta di taratura e il fattore di diluizione per ricondursi ai valori di concentrazione effettivi in mg/ml.

Al fine di ricondursi alle condizioni più prossime a quelle operative è stata costruita una seconda retta di taratura, sempre con l'albumina, utilizzando un buffer a pH 10, adatto all'immobilizzazione e nel range delle condizioni operative ottimali dell'enzima.

### 2.6.2 Svolgimento prove di immobilizzazione

Le prove di immobilizzazione sono state effettuate nel laboratorio FERMAN e hanno previsto l'utilizzo di un agitatore, una bilancia, un mortaio, ancorette, becher e parafilm. Per la lunghezza della prova, svoltasi a temperatura ambiente, si è preferito coprire i becher nei quali

avveniva l'agitazione per evitare eventuali contaminazioni e allontanamento di vapori di buffer.

In ogni becher è stata messa una quantità pesata di materiale sul quale l'enzima verrà adsorbito e 10ml di soluzione nella quale l'enzima ha una concentrazione 0,1mg/ml. Il materiale, prima di essere pesato, è stato finemente sminuzzato con l'utilizzo di un mortaio in modo da crearne una polvere fine e rendere in questo modo più agevole l'accesso alla proteina delle porosità del materiale. La soluzione con l'enzima è costituita da 0,12 ml di enzima fornito dall'azienda produttrice e 49,88 ml di buffer carbonato con concentrazione 5mM a pH10 (corrispondente ad una diluizione di circa 1:417). Esso è stato ottenuto sciogliendo in 1l di acqua distillata 193,811mg di NaHCO<sub>3</sub> e 285,4mg di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Il pH è stato regolato attraverso l'utilizzo del pHmetro, di una soluzione 0,1M di NaOH e una soluzione 0,1M di HCl.

Le prove hanno richiesto un tempo di agitazione di 5h e sono state svolte in triplicato. Evidenze da fonti di letteratura indicano che, al fine di avere una buona immobilizzazione, occorra un rapporto tra  $m_{enzima}$  e  $g_{biochar}$  almeno superiore a 1. In questo studio sono stati posti a contatto 1mg di enzima (da 10ml di soluzione in cui l'enzima è concentrato 0,1mg/ml) con 0,1g di biochar quindi il rapporto tra  $m_{enzima}$  e  $g_{biochar}$  ha assunto valore pari a 10. È riportata di seguito la tabella indicante le masse dei diversi materiali utilizzati.

Quantità [mg]	Biochar	Biochar attivato	Biochar funzionalizzato	Biochar attivato funzionalizzato
Test 1	101,6	99,8	99,4	99,5
Test 2	99,7	101,5	100,6	100,5
Test 3	101,4	100,1	100,9	99,6

Tabella 2 Quantità di BC pesata per i test di immobilizzazione

In queste prove sono stati utilizzati materiali sottoposti a diversi trattamenti, questo al fine di notare differenze nella resa di immobilizzazione. Si dovrà tener conto dei diversi trattamenti ai quali viene sottoposto il supporto prima di venire utilizzato in fase di immobilizzazione. I legami che si vengono a creare e che uniscono enzima e supporto dipendono fortemente dalle caratteristiche superficiali, le quali subiscono variazioni in base ai reagenti e alle condizioni di processo utilizzati per le modifiche.

## 2.7 Misura attività enzimatica

In seguito all'immobilizzazione dell'enzima sui diversi supporti è stata valutata l'attività enzimatica dello stesso. Non è infatti scontato che, in seguito alla formazione dei legami che legano l'enzima al supporto, esso mantenga una certa attività poiché i legami che vengono a crearsi possono modificare la geometria dell'enzima e le sue caratteristiche conformazionali. Può infatti accadere, specialmente nel caso di *multipoint attachment* ovvero quando un enzima si lega al supporto grazie a più di un legame, che la mobilità intrinseca della proteina, che consente all'enzima di agire nel suo ruolo di catalizzatore, sia compromessa in maniera irreversibile dalla presenza di tali legami e quindi l'attività si annulla.

Per valutare l'attività enzimatica è necessario un test di attività svolto mediante l'uso di una proteina che l'enzima preso in analisi sappia idrolizzare. In questo caso studio la proteina utilizzata per valutare l'attività enzimatica è la caseina. È stato necessario un confronto di attività dell'enzima diluito e dell'enzima immobilizzato sul supporto. Si descrive di seguito la

procedura utilizzata per la valutazione dell'attività enzimatica. Esistono in letteratura delle procedure standard per quantificare l'attività di una generica proteasi; infatti, questo genere di test è applicabile a diversi enzimi.

Quando la caseina è idrolizzata da un enzima di tipo proteasi di cui si vuole misurare l'attività, viene liberato l'amminoacido *tirosina* insieme ad altri frammenti amminoacidici e frammenti di peptidi. Il reagente di Folin reagisce con l'amminoacido tirosina conferendo alla soluzione in cui è contenuto una colorazione blu ben visibile. Questo rende quantificabile la presenza di tirosina nel campione da analizzare attraverso l'uso di uno spettrofotometro con una lunghezza d'onda pari a 660nm. Esiste una proporzionalità diretta tra la concentrazione di tirosina e il valore di assorbanza misurato. Inoltre, tanto più è concentrato l'amminoacido tirosina nella soluzione da analizzare e tanto più la colorazione che assumerà una volta in contatto col reagente di Folin tenderà ad assumere colori scuri. Per interpretare in maniera corretta i valori di assorbanza ottenuti dalle analisi spettroscopiche è necessario l'utilizzo di una retta di taratura. La retta di taratura viene realizzata grazie all'utilizzo di una soluzione a concentrazione nota di L-tirosina, in questo caso studio si è preparata una soluzione di partenza con tale amminoacido disciolto in acqua la cui concentrazione molare fosse 1,1mM. Dalla retta di taratura si possono ottenere risultati in termini di *Units* che corrisponde alla quantità di micromoli di tirosina equivalenti rilasciate in un minuto a partire dalla caseina.

#### 2.7.1 Retta di taratura per attività enzimatica

Il primo step per la costruzione della retta di taratura è la preparazione degli standard a concentrazione crescente di tirosina e di un bianco. Sono stati preparati sei standard con, rispettivamente, 50, 100, 200, 400, 500 e 600 $\mu$ l di soluzione di tirosina e in ciascuno di essi si è aggiunta acqua distillata fino al raggiungimento del volume finale di 2ml. È stato preparato anche un bianco al fine di tarare lo spettrofotometro utilizzando solo 2ml di acqua distillata.

In un secondo momento sono stati aggiunti 5ml di carbonato di sodio 500mM (soluzione acquosa) ai sei standard e al bianco.

Successivamente è stato aggiunto 1ml di reagente di Folin 0,5M a ciascuno dei campioni da esaminare.

Si è infine lasciato reagire il reagente di Folin incubando le provette per 30 minuti a 37°C e agitandole.

Il contenuto delle provette è stato spostato in cuvette adatte alle misure spettroscopiche ed è stata misurata l'assorbanza di ciascuno standard dopo aver tarato lo strumento con il bianco preparato senza L-Tirosina.

#### 2.7.2 Svolgimento prove per misura attività enzimatica

In seguito alla costruzione della retta di taratura si è valutata l'attività dell'enzima diluito. Questo per avere, in seguito, un paragone per quanto concerne l'attività dell'enzima senza eventuali modifiche dovute all'immobilizzazione. Si è quindi valutata l'attività dell'enzima diluito 1:2000, la diluizione ha previsto l'utilizzo di 50 $\mu$ l di enzima non diluito in 100ml di buffer acetato 5mM (ottenuto sciogliendo in 500ml di acqua 700mg di acetato di sodio triidrato e 400mg di acetato di calcio) a pH7,5 (utilizzando NaOH 0,1M e acido acetico per portare al valore di pH desiderato).

Per la valutazione dell'attività enzimatica è necessario mettere a contatto per un determinato tempo l'enzima e la proteina che verrà idrolizzata. È importante tenere conto

precisamente dei tempi di reazione in quanto potrebbero, in fase di analisi, ricondurre a conclusioni imprecise se non corretti.

Sono stati preparati tre test e una provetta per il bianco nei quali sono stati posti in un primo momento 5ml di caseina 0,65% w/v. Per la preparazione della caseina è stato necessario l'utilizzo di un agitatore con termocoppia collegata; infatti, la caseina è stata sciolta in buffer fosfato 50mM a pH 7,5 (ottenuto sciogliendo 5,7g di  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  in 500ml di acqua distillata e regolando il pH con HCl e NaOH) e riscaldata a 85°C per 10 minuti. Per evitare degradazioni dei preparati necessari a questo test, fra la preparazione e l'analisi e fra prove delle stesse analisi i reagenti sono stati conservati in frigorifero.

Dopo aver aggiunto la caseina nei tre test è stato aggiunto 1ml di enzima diluito 1:2000 e le provette sono state agitate per 10 minuti a 37°C. Terminata questa agitazione sono stati aggiunti 5ml di acido tricloroacetico 110mM nei tre test e nel bianco. Solo nel bianco, dopo aver aggiunto l'acido tricloroacetico, è stato aggiunto 1ml di enzima. Lo scopo dell'acido tricloroacetico è quello di inattivare immediatamente l'enzima bloccando la sua attività, l'enzima aggiunto dopo l'acido nel bianco sarà denaturato istantaneamente pertanto non potrà nemmeno iniziare l'idrolisi della caseina presente nel campione. In seguito a questo passaggio si riprende la miscelazione delle provette a 37°C per mezz'ora.

In seguito a quest'ultima agitazione il contenuto delle provette presenta una fase limpida e un corpo di fondo costituito da proteine coagulate. Pertanto, è necessaria una filtrazione mediante l'uso di siringhe e trottolo filtranti.



Figura 16 Aspetto proteine coagulate dopo aggiunta acido

Dopo la filtrazione delle proteine coagulate, il filtrato avrà al suo interno una certa quantità di tirosina che va misurata mediante l'uso dello spettrofotometro e dopo i passaggi previsti dal saggio di Folin. Analogamente a quanto fatto in precedenza con gli standard per la costruzione della retta di taratura, al filtrato (prelevato in quantità pari a 2ml) sono stati aggiunti 5ml di carbonato di sodio 500mM e 1ml di reagente di Folin 0,5M. In seguito, le provette sono state agitate in un incubatore per 30 minuti alla temperatura costante di 37°C.

In seguito a questa operazione l'aspetto dei campioni varia in base alla quantità di tirosina presente in essi, i tre test sono riconoscibili dal colore blu che assumono in seguito all'aggiunta del reagente di Folin mentre il bianco dal colore quasi trasparente che è mantenuto durante tutto il saggio. Può essere necessario filtrare il contenuto delle provette una volta terminata l'agitazione per via di impurità legate alla presenza di aminoacidi che

potrebbero nuovamente coagulare e falsare le misurazioni allo spettrofotometro. L'aspetto del liquido sul quale andranno fatte le analisi dev'essere limpido. Si riporta di seguito un'immagine dei provini ottenuti dopo aver effettuato i passaggi citati fino a questo punto.

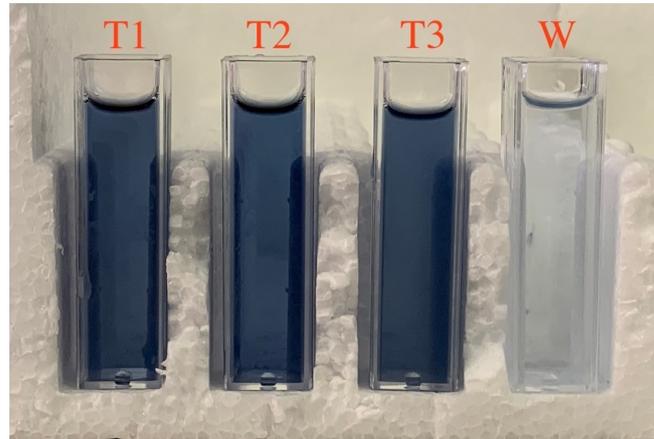


Figura 17 Aspetto dei test per misura attività enzimatica Alcalase diluito 1:2000

È stata valutata a partire dai valori di tirosina legati a ogni test l'attività enzimatica dell'enzima diluito. Dapprima è stato calcolato il rapporto tra la quantità di tirosina e il tempo di reazione (nello studio descritto 10 minuti, il tempo in cui enzima diluito e caseina sono stati a contatto prima dell'aggiunta dell'acido tricloroacetico). Tale valore è stato poi diviso per la quantità in mg di enzima presente nel saggio (siccome è stato utilizzato 1mg di enzima diluito basta dividere per il valore di concentrazione di enzima diluito 1:2000 che è pari a 0,021).

Analogamente a quanto fatto per l'enzima diluito, si è valutata l'attività dell'enzima adsorbito sul supporto solido. Dopo le prove di immobilizzazione, si ricorda, tutte svolte in triplicato, è stato scelto per ogni supporto il campione tra i tre disponibili sul quale è stato immobilizzata una quantità di enzima che si discostasse il meno possibile dal valore medio.

La preparazione dei materiali sul quale è stato immobilizzato il biochar ha previsto diversi passaggi, tutti svolti con cura al fine di non degradare l'enzima immobilizzato. Come primo passaggio è stato filtrato il liquido ottenuto in seguito alle agitazioni. Esso appare come un liquido scuro nel quale il biochar è sospeso e nel quale è disciolta una quantità più o meno consistente di enzima (quest'ultima dipende dall'efficienza ottenuta nell'immobilizzazione).

La filtrazione è avvenuta mediante l'uso dell'apparecchiatura di laboratorio che permette di creare il vuoto. In una beuta è stato raccolto il liquido che è stato filtrato mediante l'uso di un imbuto, di una guarnizione e di un filtro. Tra ogni prova ogni oggetto utilizzato è stato ripulito adeguatamente per evitare contaminazioni tra un supporto e i successivi e non falsare i risultati del saggio di attività. Successivamente i filtri sono stati posti in un essiccatore e lasciati asciugare in frigorifero per una notte intera.

In seguito alla rimozione di tutto il liquido rimanente dalla fase di filtrazione in seguito all'immobilizzazione per contatto, il biochar è stato raschiato dai filtri con molta cura onde evitare di porre nelle provette anche del materiale estraneo non utile alla valutazione dell'attività enzimatica.

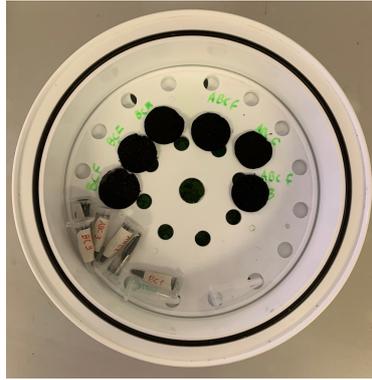


Figura 18 Essiccatore per biochar con enzima

Per la valutazione dell'attività enzimatica dell'enzima immobilizzato si è quindi pesata una quantità ben determinata di biochar in modo da avere 0,01mg di enzima in ciascuna prova. Questo dato è associato ad una variabile quantità di supporto sul quale l'enzima è immobilizzato perché le rese di immobilizzazione sono differenti nei diversi casi. Per il biochar si è trovato che è necessario utilizzare 5mg del campione 1, per il biochar attivato, in seguito alla elevata resa di immobilizzazione, è stato necessario l'utilizzo di 1mg del campione 1, per il biochar funzionalizzato è stato calcolata una quantità necessaria pari a 3,33mg del campione 2 e infine, per il biochar attivato funzionalizzato son necessari 1,42mg del campione 1.

Il calcolo per comprendere quanto materiale fosse necessario (in massa [mg]) è il seguente:

$$x [mg_{\text{supporto con enzima}}] = \frac{0,01 [mg_{\text{Alcalase}}]}{m_{\text{in Alcalase in soluzione}} - m_{\text{fin Alcalase in soluzione}} \left[ \frac{mg_{\text{Alcalase}}}{mg_{\text{supporto con enzima}}} \right]}$$

I valori in massa a denominatore sono stati ottenuti moltiplicando la concentrazione dell'enzima per il volume della soluzione utilizzata e poi dividendo il tutto per la massa di biochar utilizzata.

La procedura utilizzata per la valutazione dell'attività enzimatica nel caso dell'enzima immobilizzato è analoga a quella descritta per l'enzima diluito, in ogni provetta contenente la quantità pesata di supporto con enzima sono stati aggiunti 1ml di buffer acetato e 5ml di caseina. Sono stati poi agitati per 10 minuti a 37°C in un incubatore, successivamente è stato aggiunto l'acido tricloroacetico nelle stesse quantità della prova precedente. È stata effettuata un'agitazione per 30 minuti a 37°C, filtrato il contenuto delle provette e infine sono stati seguiti nuovamente i passaggi per il saggio di Folin: sono stati aggiunti a 2ml di filtrato 5ml di carbonato di sodio e 1ml di reagente di Folin. In seguito alla agitazione delle provette per 30 minuti a 37°C sono state effettuate le misurazioni.

In seguito alle prove di attività, con l'uso della retta di taratura, si è ottenuto un valore di concentrazione di tirosina. È stata quindi valutata l'attività U dividendo le moli di tirosina prodotta per il tempo nel quale è avvenuta l'idrolisi (10 minuti) e per confrontare il risultato di enzima immobilizzato e diluito si è calcolato il rapporto tra U e il quantitativo di enzima che ha eseguito l'idrolisi. Per quest'ultimo valore, la quantità di enzima, si è partiti dal quantitativo di enzima immobilizzato e lo si è diviso per la massa del supporto utilizzato per immobilizzarlo. Successivamente questo rapporto è stato moltiplicato al quantitativo utilizzato nel test di attività che è stato diverso in base alla resa di immobilizzazione sul supporto.

### 3 Presentazione dei risultati

In questo capitolo saranno descritti i risultati delle prove di caratterizzazione dei supporti, di immobilizzazione e della valutazione dell'attività enzimatica dell'enzima diluito e immobilizzato.

#### 3.1 Risultati caratterizzazione biochar

##### 3.1.1 Analisi elementare CHNSO

Si riportano di seguito i risultati della prova.

Sample name	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	H/C ratio	C/N ratio
Lolla di riso senza trattamenti	3,09	42,99	1,79	0,35	51,78	0,042	13,9
BC attivato con KOH (1°)	1,74	65,69	2,507	0,082	29,981	0,038	37,75
BC attivato con KOH (2°)	1,72	64,47	2,074	0,02	31,716	0,032	37,48
BC da RH a 600 °C a 15 °C/min, N2	1,5	72	2,299	0,11781	24,083	0,031	48
BC da RH a 600 °C a 5 °C/min, N2	1,53	68	1,9019	0,22275	28,345	0,0279	44,44

Tabella 3 Risultati analisi elementare ottenuti nel laboratorio FERMAN

Come accennato nella parte riguardante il biochar, ad un aumento di temperatura corrisponde una diminuzione della resa in biochar (più syngas e tar vengono prodotti). Di conseguenza anche la composizione elementare andrà incontro a modifiche in seguito alla temperatura di pirolisi. Condizioni più spinte in termini di velocità di riscaldamento e di temperatura causano un aumento nell'aromaticità del biochar a discapito della componente organica che prevarrà per trattamenti con temperature più basse. Dai dati della tabella 3 si nota che il componente più abbondante è il carbonio, ciò è dovuto al fatto che la matrice di partenza è organica e i residui organici come, ad esempio, la cellulosa rendono il carbonio l'elemento più presente nel biochar. In seguito alla carbonizzazione la quantità in percentuale di carbonio aumenta, questo per via della degradazione che causa un allontanamento sotto forma di composti volatili di atomi non-carboniosi.

Sample name	N [%]	C [%]	H [%]	H/C ratio	C/N ratio
BC 250°C	0,68	38,11	3,61	0,095	56,04
BC 350°C	0,73	34,67	2,52	0,073	47,49
BC 450°C	0,73	35,00	2,17	0,062	47,95
BC 550°C	0,63	31,77	1,67	0,053	50,42

Tabella 4 Risultati analisi elementare dallo studio [20]

Nella tabella 4 sono riportati i valori delle analisi dello studio di A Rahmat et al. [20], l'obiettivo dello studio era comprendere l'effetto delle diverse condizioni di pirolisi

(temperatura e velocità di riscaldamento) utilizzate per ottenere biochar a partire dalla lolla di riso. Il confronto che si può fare tra le misurazioni ottenute e quelle dello studio basa le proprie considerazioni sui rapporti H/C e C/N. Un aumento della temperatura di pirolisi e della velocità con la quale la biomassa è riscaldata porta ad un allontanamento più rapido di acqua e ad un aumento di aromaticità. A partire dai dati riportati dello studio si nota un decremento del rapporto H/C all'aumentare della temperatura poiché i composti che si allontanano con più facilità tendono ad essere molecole contenenti atomi di O e H (si può notare infatti una notevole decrescita del contenuto di ossigeno della lolla di riso ancora da trattare in confronto al biochar). La temperatura di pirolisi più alta riportata nello studio è 550°C e il rapporto finale è 0,053. In questo caso studio il biochar è stato realizzato mantenendo la temperatura a 600°C e i rapporti H/C sono inferiori a quelli dello studio trovato in letteratura [20], in accordo con gli andamenti attendibili a partire dai dati dello studio. Si osserva inoltre che il massimo rapporto H/C si ha quando la lolla di riso non ha subito trattamenti termici che possano causare variazioni nella sua composizione. Si nota inoltre una generale riduzione del rapporto C/N all'aumentare della temperatura dai dati dello studio riportato. I dati ottenuti attraverso le analisi svolte al FERMAN non smentiscono questo andamento mostrando valori minori rispetto al valore raggiunto ad una temperatura di 550°C questo parametro è connesso alla presenza di proteine, alla contaminazione della matrice organica da materiali del suolo ed alla disidratazione del biochar [21][22].

Come considerazioni finali, alla luce dei risultati ottenuti e del confronto con i dati trovati in letteratura, si può quindi affermare che il basso rapporto H/C indica una buona conversione della materia organica che ha generato un prodotto carbonizzato ricco in composti aromatici. La presenza di C in grandi quantità è giustificata dall'origine della biomassa di partenza, la crescita, in percentuale, del contenuto di zolfo è dovuta all'allontanamento di composti più volatili e umidità (contenenti O e H) in seguito al riscaldamento. Il contenuto di azoto che diminuisce in seguito ai trattamenti segue gli andamenti previsti, ovvero, decresce per via della degradazione termica di alcune proteine presenti nella biomassa di partenza.

### 3.1.2 Analisi FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy)

Come si può notare dalle immagini riportate di seguito, entrambi i biochar hanno una elevata porosità superficiale. Il trattamento di attivazione con l'idrossido di potassio ha causato delle alterazioni superficiali, esse si possono osservare in foto e appaiono come dei piccoli crateri sulla superficie del biochar. Questo fa sì che la porosità e la superficie specifica aumentino ma l'effetto positivo della attivazione chimica non si limita ad aspetti morfologici ma aumenta anche la presenza di gruppi funzionali sulla superficie che però non possono essere osservati con questo tipo di analisi.

Infine, sono stati fotografati anche dei campioni di carbone attivo. Le porosità non si notano come nel biochar e l'aspetto della superficie risulta molto più uniforme. Questo è causato da un diverso ingrandimento utilizzato nelle analisi e da un aspetto intrinsecamente differente dei due materiali. La figura 18 contiene una serie di immagini raffiguranti l'aspetto della lolla di riso in uno stato precedente ai trattamenti pirolitici. Si può notare che l'aspetto della superficie e del bordo del materiale risulta continuo e privo di porosità, ciò renderà difficile l'immobilizzazione dell'enzima sul materiale in questo stato. Confrontando le superfici visibili dalle immagini FESEM nelle figure 18 e 19 si può notare una differenza anche sulla regolarità delle stesse. Senza trattamenti la superficie appare liscia e con alcune protuberanze che si ripetono in maniera regolare, dopo la pirolizzazione invece sono più irregolari e con più punti d'appiglio per eventuali sostanze che entrano in contatto. Anche la

sezione del materiale visibile nell'immagine al centro della figura 18 è molto meno porosa rispetto alla sezione del biochar. Ad occhio può apparire simile la superficie della lolla di riso con l'immagine del carbone attivo per il loro aspetto regolare, tuttavia, in termini di superficie specifica non sono nemmeno confrontabili. Ciò è dovuto alla presenza di molte porosità molto compatte presenti in quest'ultimo.

Non tutte le immagini riportate sono state ottenute con lo stesso ingrandimento. Per le informazioni sugli ingrandimenti e sul vuoto presente nell'apparecchiatura al momento dello scatto dell'immagine si faccia riferimento alla descrizione riportata sotto le immagini.



Figura 19 Immagini FESEM lolla di riso non trattata

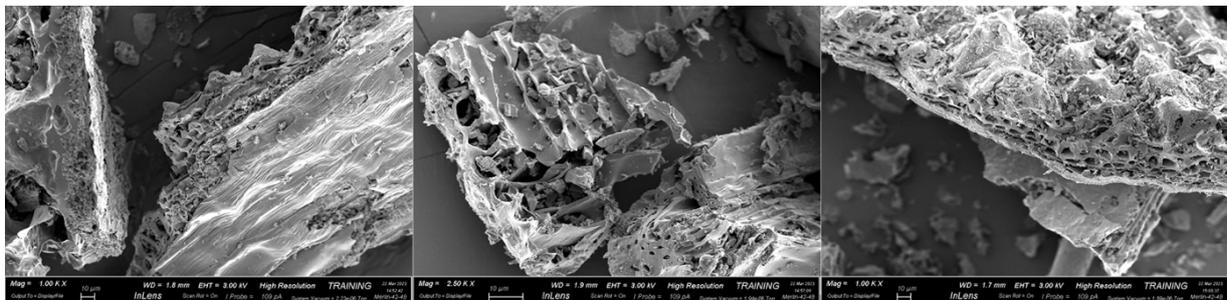


Figura 20 Immagini FESEM biochar

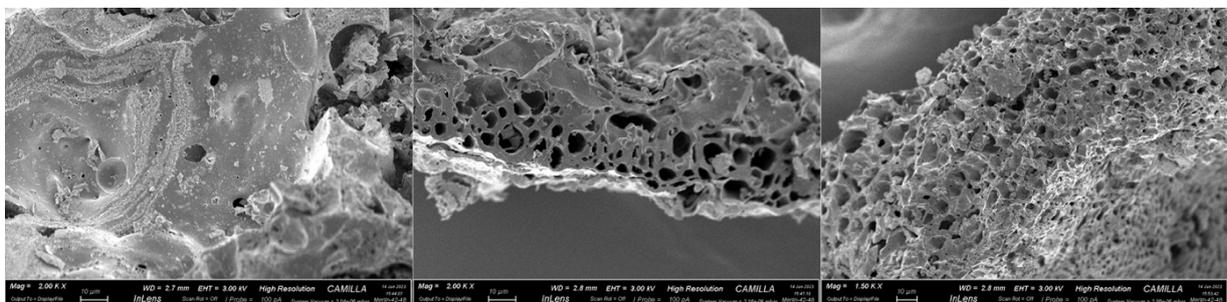


Figura 21 Immagini FESEM biochar attivato

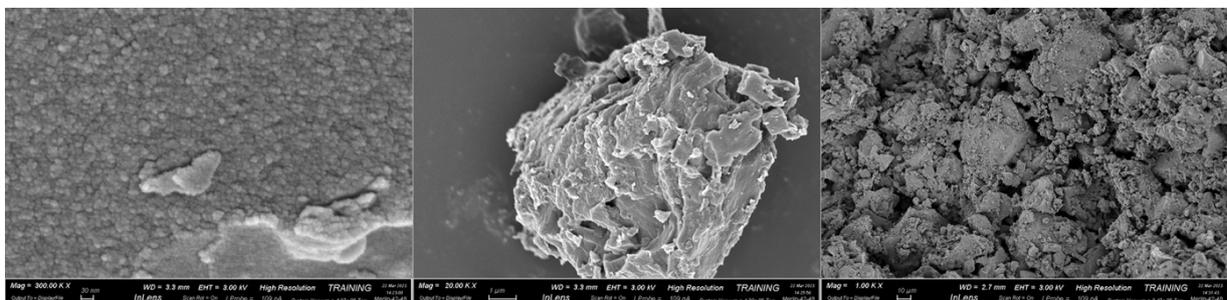


Figura 22 Immagini FESEM carbone attivo

### 3.1.3 Valutazione point of zero charge

Si riportano di seguito i diagrammi riportanti la variazione di pH ( $\text{pH}_{\text{fin}} - \text{pH}_{\text{in}}$ ) in funzione del pH di partenza.

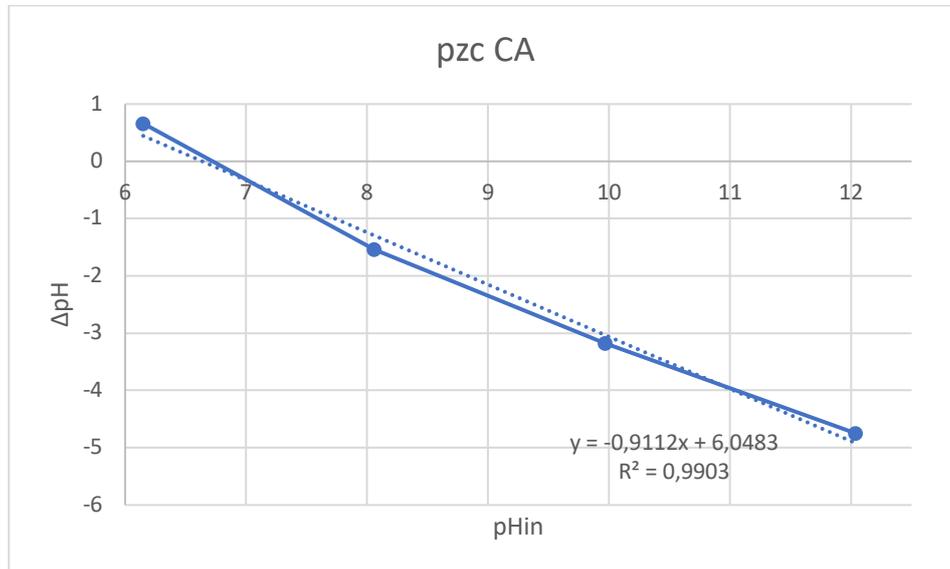


Grafico 1 Valutazione pzc carbone attivo

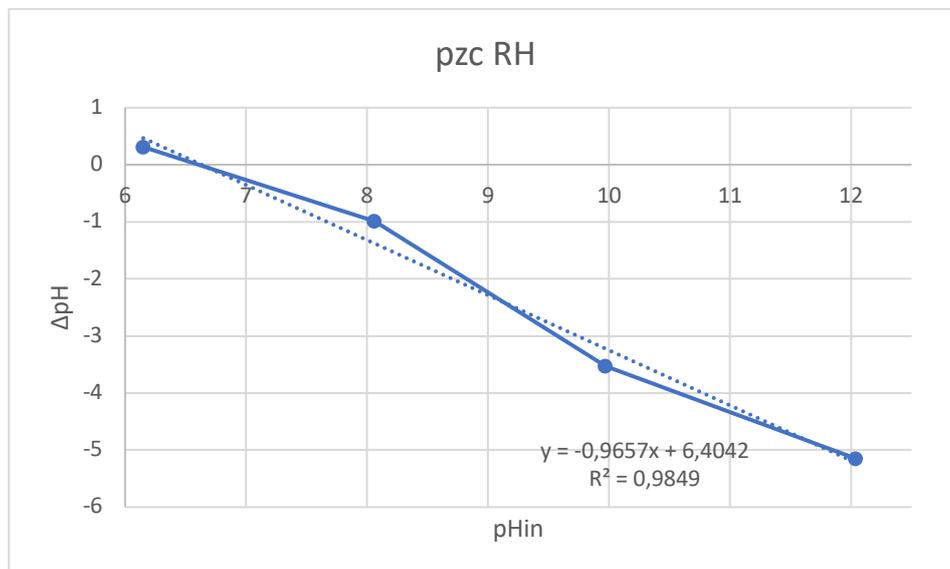


Grafico 2 Valutazione pzc BC da rice husk

Nello studio non è stata eseguita una analisi sul *point of zero charge* (*pzc*) del materiale di partenza; tuttavia, è possibile trovare dei riferimenti in letteratura, ad esempio nello studio condotto da Praveen Kolar et al. della *North Carolina University* [23] dove è riportato un valore del pzc del rice husk, non soggetto a nessun trattamento, pari a 6,18. Questo valore indica che il comportamento sarà carico negativamente in soluzioni acquose il cui pH è superiore a questo valore.

Dai grafici risulta quindi che il *pzc* si trovi a valori di pH 6,63 per il biochar da rice husk e 6,64 per il carbone attivo. La prova è stata effettuata a valori di pH basici poiché l'enzima che sarà utilizzato, l'Alcalase, lavora in queste condizioni.

Per quanto riguarda i dati disponibili consultando la letteratura, essi si discostano rispetto a quanto trovato in questo studio. Tuttavia, in molti studi è di comune accordo giungere a valori del *pzc* inferiori a 10 (valore di pH del buffer utilizzato nelle nostre prove) pertanto il comportamento del biochar in queste condizioni varierà leggermente ma sarà comunque mantenuta in ogni caso una carica negativa sulla sua superficie dovuta alle condizioni operative. Nello studio di Yuhuan Yang et al. [24] è stato trovato un valore per il biochar non attivato pari a 7,67.

Al fine di adsorbire l'enzima sulla superficie del biochar sarà quindi necessario tenere conto del valore di pH del buffer nel quale l'enzima viene preparato poiché esso avrà effetti sulla carica superficiale del supporto (attraverso gli andamenti visti con il *pzc*) e avrà anche effetti sulla carica complessiva della proteina. La carica complessiva, infatti, varia al variare del pH, in biochimica esiste il parametro *punto isoelettrico* che indica il valore di pH al quale la proteina ha carica nulla poiché la dissociazione acida dei due gruppi: amminico e carbossilico avviene in ugual entità. Per valori di pH maggiori rispetto al punto isoelettrico la proteina avrà una carica complessiva negativa mentre per pH più acidi la carica complessiva della stessa sarà positiva.

È quindi necessario trovare un buon compromesso per quanto riguarda il pH che possa rendere supporto ed enzima carichi in maniera opposta per avere una attrazione elettrostatica tra i due. Inoltre, si deve restare all'interno del range di operabilità dell'enzima. Gli aspetti che sono regolati da variazioni del pH hanno effetti sui legami dovuti allo scambio ionico. Essi possono avere un ruolo sinergico nell'immobilizzazione enzimatica con il ruolo operato dalla glutaraldeide che causa la formazione di legami di tipo covalente.

### 3.1.4 Analisi BET

Si riportano di seguito i valori delle analisi BET svolte in laboratorio e trovate in letteratura dai report di studi svolti in condizioni di pirolisi simili a quelle utilizzate nello studio descritto.

Materiale	BC (N <sub>2</sub> ) 5 °C/min	BC (N <sub>2</sub> ) 15 °C/min	BC KOH (N <sub>2</sub> ) 15 °C/min	Carbone attivo
Superficie specifica [m <sup>2</sup> /g]	46,0980	55,7013	178,007	1459,89
Volume totale dei pori [cm <sup>3</sup> /g]	0,0142	0,0178	0,0993	0,987

Tabella 5 Dati BET misurati

Si può notare fin da subito che i parametri di superficie specifica e di volume dei pori caratteristici del carbone attivo siano di molto superiori anche al migliore dei casi del biochar (corrispondente al caso attivato).

Materiale	BC 400°C 2h [24]	RH non trattato [23]	BC 550°C 2h [25]	BC 500°C 1h [26]	BC 37°C/min 550°C [27]	BC 37°C/min 550°C, H <sub>2</sub> O att. [27]
-----------	------------------	----------------------	------------------	------------------	------------------------	---

Superficie specifica [m <sup>2</sup> /g]	4,01	0,1403	29,71	13,6	45,34	351,23
Volume dei pori [cm <sup>3</sup> /g]	0,0103	-	-	0,0076	0,057	0,315

Tabella 6 Dati BET letteratura

In riferimento alle tabelle 5 e 6 si specifica che il materiale di partenza per il biochar è sempre la lolla di riso. Dove, in letteratura, non è stata riportata la velocità di riscaldamento, sono state riportate le temperature mantenute durante la pirolisi.

Dalle tabelle si può notare che attraverso le misure di queste grandezze non si può delineare una correlazione ben precisa tra le condizioni operative e i valori ottenuti. Spesso negli studi non sono riportate le velocità di riscaldamento che influiscono di molto sulla porosità del biochar. I dati dello studio [24] sono quelli sui quali si possono fare delle considerazioni analoghe ai dati ottenuti nel presente studio, infatti:

- Le temperature utilizzate nello studio sono state di 550°C, durante le prove svolte si è scelta una temperatura di 600°C.
- Il riscaldamento è avvenuto a 37°C/min, nelle prove svolte nel lavoro di tesi invece il riscaldamento è avvenuto a 15°C/min.
- I valori di area superficiale e volume dei pori sono di ordini di grandezza confrontabili sia nel caso del biochar non attivato che per quello attivato. L'attivazione nello studio da letteratura è stata effettuata con l'uso di acqua mentre nel presente studio con idrossido di potassio.

Come considerazioni generali per quanto riguarda la superficie specifica, osservando i dati ottenuti in laboratorio e da studi riportati in letteratura, si può affermare che in seguito ad un riscaldamento più spinto si otterrà un biochar la cui superficie specifica è di poco maggiore. Ciò è dovuto ad un più rapido allontanamento dei composti volatili che causano: porosità più grandi in volume (circa del 25%) e di conseguenza un aumento di superficie specifica (circa del 20%).

Gli aumenti più netti si possono notare nel caso dell'attivazione chimica, infatti, a parità di velocità di riscaldamento e di temperatura e tempo a cui la materia prima è soggetta a pirolisi, un trattamento successivo con una base forte causa cambiamenti importanti nella morfologia del biochar. A quanto si poteva notare già in maniera qualitativa attraverso l'analisi FESEM si calcola un aumento di superficie specifica (che è più che triplicata) e di dimensione dei pori, il cui volume è aumentato di oltre cinque volte.

### 3.1.5 Spettroscopia FTIR-ATR

In ogni spettro sono presenti molti picchi dovuti alla presenza di altrettanto numerosi gruppi funzionali presenti sulla superficie. La presenza di ogni picco con una determinata forma/intensità e che si trova ad un preciso numero d'onda è correlato ad un preciso gruppo funzionale attraverso la comparazione con casi studio analoghi trovati in letteratura [28][29] [30] [31] [32] [33] [34] [35]. Non tutti i picchi sono stati correlati ad un gruppo funzionale, tuttavia, sono stati esaminati quelli associati ai gruppi funzionali che devono necessariamente essere presenti sulla superficie dopo i trattamenti di attivazione e funzionalizzazione mentre un'analisi più completa è stata fatta sui, meno numerosi, picchi presenti sul materiale di

partenza e sul materiale solamente pirolizzato. Alcuni picchi possono presentare dei discostamenti nelle frequenze a cui appaiono rispetto agli studi presi in considerazione. Tali scostamenti sono accettabili e sono attribuiti a diverse condizioni in cui il materiale è stato esaminato, l'impiego di diverse apparecchiature per le analisi, diversi trattamenti sul materiale e infine alle differenze nella provenienza della materia prima che è stata trattata.

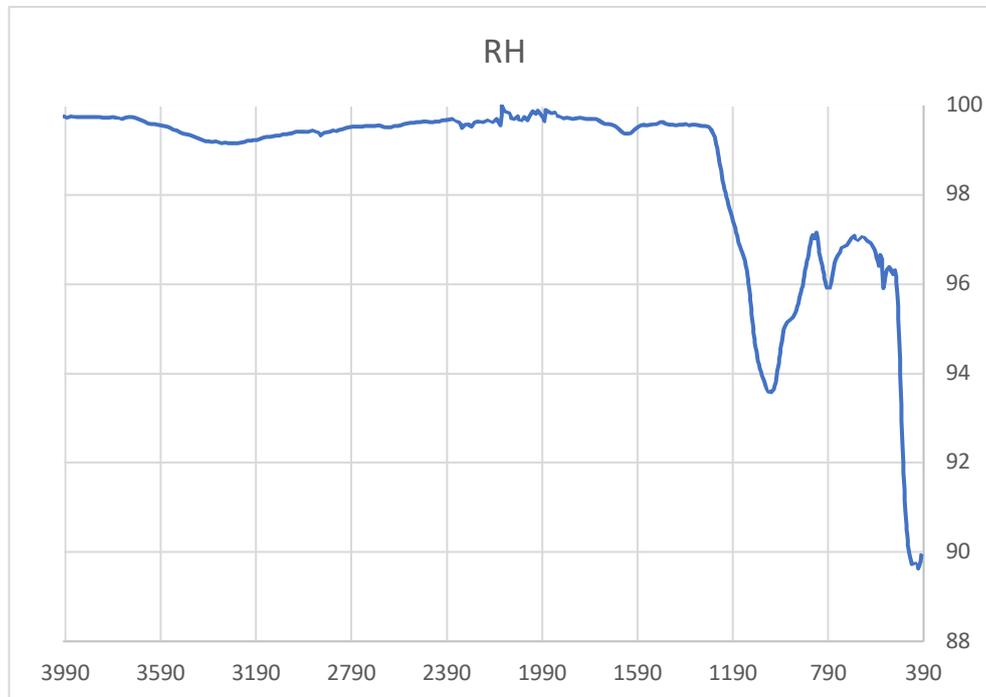


Grafico 3 Spettro IR della lolla di riso non trattata

Per quanto riguarda la descrizione dello spettro ottenuto esaminando la lolla di riso che non ha subito trattamenti pirolitici, partendo da sinistra ossia a valori di frequenze più alte si può notare:

- Un picco molto spanciato a 3300 che è attribuito allo stretching di gruppi ossidrilici (-OH).
- Due picchi molto deboli alle frequenze 2920 e 2850 che sono attribuiti allo stretching asimmetrico e vibrazionale dei gruppi -CH<sub>2</sub> delle catene alifatiche.
- Una serie di ondolazioni nell'intervallo tra 2300 e 1950 che prendono il nome di *overtone*s che non danno informazioni sulla composizione del campione ma sono dovuti all'assorbimento da parte delle molecole degli infrarossi, i quali causano un cambiamento nello stato energetico vibrazionale.
- Il picco spanciato e abbastanza debole alla frequenza 1630 indica la presenza di gruppi contenenti un gruppo carbossilico.
- Il picco di media intensità alla frequenza 1030 è dovuto allo stretching asimmetrico dei legami tra Si-O-Si.
- Il picco di intensità più bassa del precedente alla frequenza 790 è dovuto allo stretching simmetrico dei legami tra Si-O-Si.
- I valori ottenuti per frequenze più basse possono essere meno attendibili perché per queste frequenze è più complesso effettuare misurazioni e attribuire agli andamenti, con una certa sicurezza, un corrispondente effetto su diversi gruppi funzionali.

Da informazioni riportate in diversi studi è indicato che la presenza di due picchi alle frequenze 1100 e 808 corrispondono alla presenza della struttura  $\text{SiO}_2$ . Queste bande sono effettivamente osservate nello spettro ottenuto, sebbene leggermente traslate, ciò giustifica l'utilizzo di lolla di riso come fonte alternativa di silicio [28].

Si riportano di seguito i grafici dove viene fatto il confronto dello spettro tra biochar non attivato e attivato:

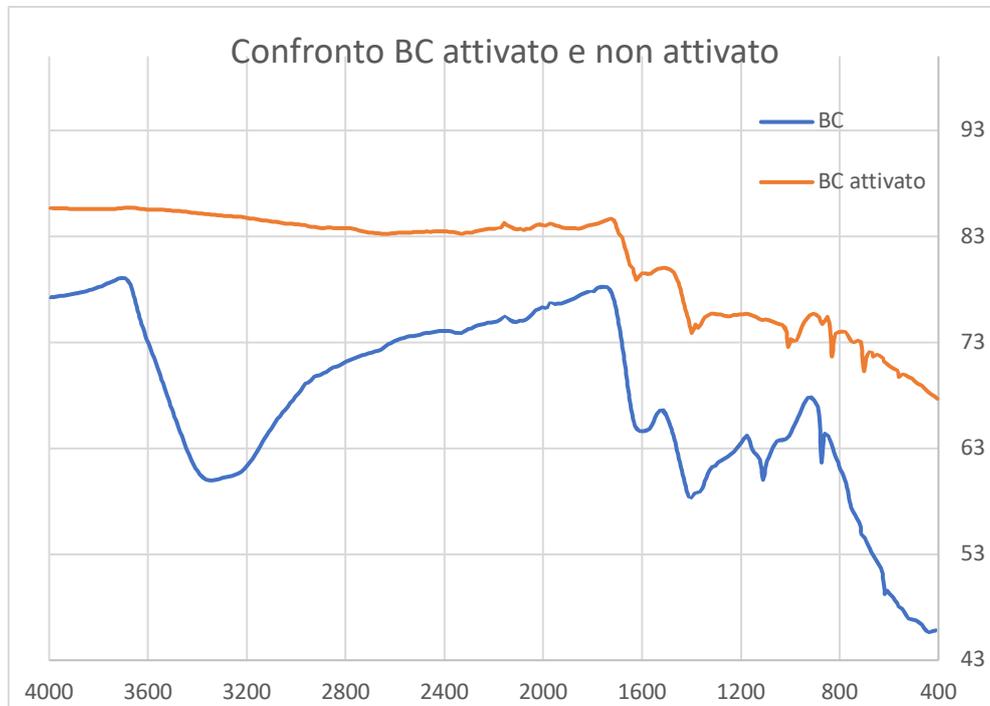


Grafico 4 Spettro IR confronto BC attivato e non attivato

Il grafico, come il precedente, per alti numeri d'onda mostra la presenza del gruppo  $-\text{OH}$ , esso è particolarmente evidente nel caso del biochar non attivato. Oltre a questo dato si possono notare:

- Un picco molto poco evidente a 2330 in entrambi gli spettri, indica lo stretching del gruppo C-N.
- Un picco spanciato e debole presente in entrambi i materiali a 2100 che indica un triplo legame tra due atomi di C oppure la presenza di un azoturo [29].
- Un picco a 1980 che potrebbe essere legato alla presenza di un legame tra Si e H [30].
- Il picco spanciato alla frequenza 1600 indica la presenza di gruppi contenenti un gruppo carbossilico, il picco è dovuto al suo stretching.
- I picchi alle frequenze 1390 e 1260 possono essere attribuiti allo stretching di  $-\text{OH}$  e  $-\text{CH}$  [31].
- Il picco di intensità presente nel BC non attivato al numero d'onda  $1110\text{cm}^{-1}$  è attribuibile allo stretching di un gruppo  $-\text{CO}$  presente nella struttura di un polisaccaride [31].
- Nel caso del BC attivato il picco presente a 1000 è attribuibile alla vibrazione del legame C-O. [32]
- Il picco presente al numero d'onda 870 nel biochar è associato allo stretching asimetrico di anelli di epossidi. [33]

A seguire sono descritti gli spettri del biochar non attivato e attivato soggetto ai trattamenti di funzionalizzazione con etilendiammina e glutaraldeide.

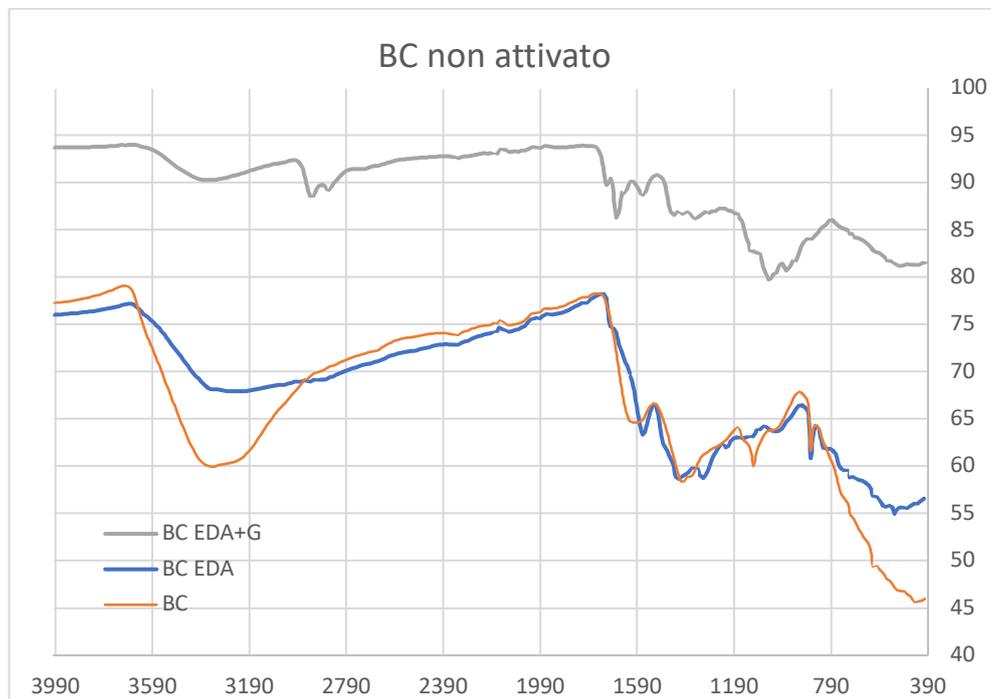


Grafico 5 Spettro IR biochar funzionalizzato

Dal confronto dei grafici emergono alcune differenze ma anche delle analogie in seguito alla funzionalizzazione. In particolare:

- In entrambi gli spettri con la funzionalizzazione completa è presente il picco spanciato indicante la presenza dei gruppi -OH ad alte frequenze.
- In entrambi gli spettri è possibile notare un picco intorno alle frequenze  $3310\text{ cm}^{-1}$ , questo indica lo stretching di un gruppo -NH presente in maniera netta (nel caso del BC attivato) solo in seguito al trattamento con etilendiammina.
- Due picchi vicini presenti in entrambi i casi al numero d'onda  $2920$  e  $2860$  essi sono attribuiti allo stretching asimmetrico e stretching vibrazionale dei gruppi -CH<sub>2</sub>- presenti nelle catene alifatiche [34].
- Il picco presente a  $1680$  indica la presenza di un gruppo C=O indice del fatto che, almeno in parte, la glutaraldeide utilizzata nella funzionalizzazione si è fissata su entrambi i biochar. La presenza del gruppo funzionale C=O, infatti, è provata dal fatto di picchi nell'intervallo tra  $1600$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  [35].
- I picchi che sono evidenti dopo i trattamenti con etilendiammina nei due spettri a frequenza  $1550-1500\text{ cm}^{-1}$  indicano la presenza di una ammina secondaria [35].
- I picchi che si possono osservare in seguito ai trattamenti con etilendiammina nei due spettri nelle vicinanze del numero d'onda a  $1300\text{ cm}^{-1}$  indicano la presenza di una ammina terziaria. Questi picchi e quelli descritti nel punto precedente sono indici del fatto che nel primo step della funzionalizzazione, ovvero il trattamento con etilendiammina, sulla superficie sono venuti a legarsi dei gruppi funzionali che aiuteranno nella creazione di legami durante il processo di immobilizzazione [35].

- In entrambi i casi il picco a  $870\text{ cm}^{-1}$ , indice del fatto che anelli di epossidi erano presenti sulle superfici dei materiali e venivano sollecitati attraverso l'irradiazione dell'onda a tale frequenza, in seguito ai due trattamenti non sono più presenti nello spettro.

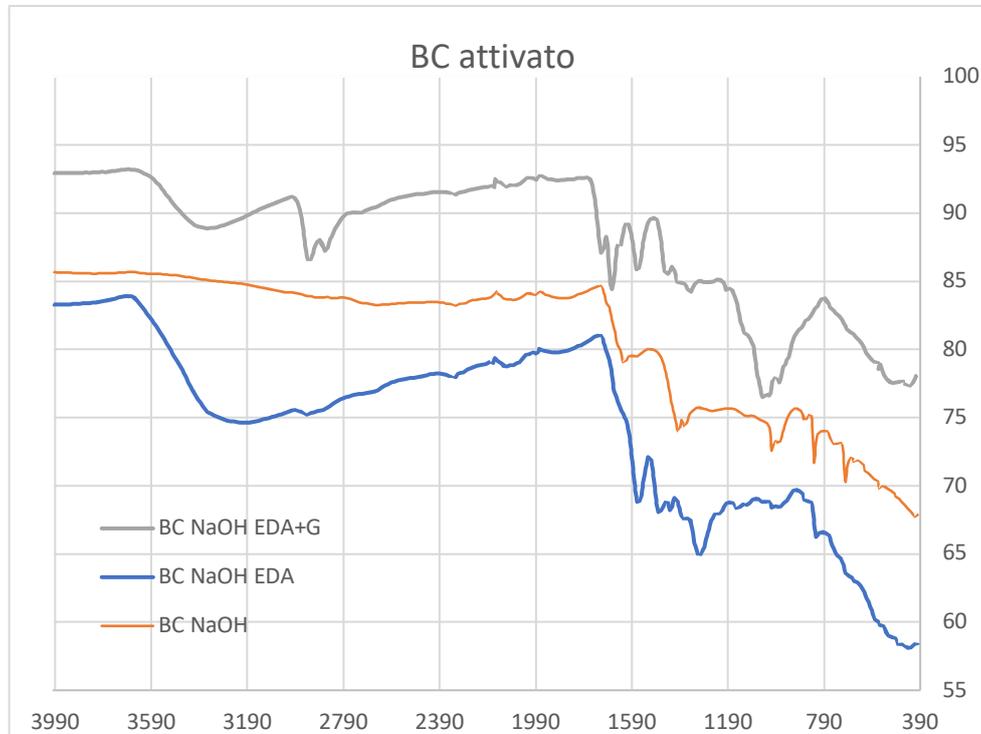


Grafico 6 Spettro IR biochar attivato e funzionalizzato

Nella discussione precedente sono state fatte considerazioni sugli spettri ottenuti attraverso l'analisi di campioni di biochar e materia ancora da trattare, è stato necessario l'utilizzo di pochi mg di ciascuna sostanza da analizzare.

## 3.2 Prove di immobilizzazione

### 3.2.1 Retta di taratura

I risultati del saggio di Bradford con il buffer a pH 7 hanno dato la seguente retta di taratura (Grafico 7).

Di seguito (Tabella 7) si riportano i risultati ottenuti nella costruzione della retta di taratura a pH 10 (valore ottimale per l'immobilizzazione). Poiché è necessaria la misura di concentrazioni anche molto basse di enzima si è optato per aggiungere dei punti nella costruzione della retta di taratura a concentrazioni più basse, tuttavia, per limiti nelle misurazioni di concentrazioni così basse dello strumento, i valori affidabili sono limitati inferiormente dal valore di concentrazione standard  $0,01\text{mg/ml}$ . Come si può notare dalla tabella 7 il valore di assorbanza ha raggiunto valori negativi per una concentrazione standard di  $0,03\text{mg/ml}$ .

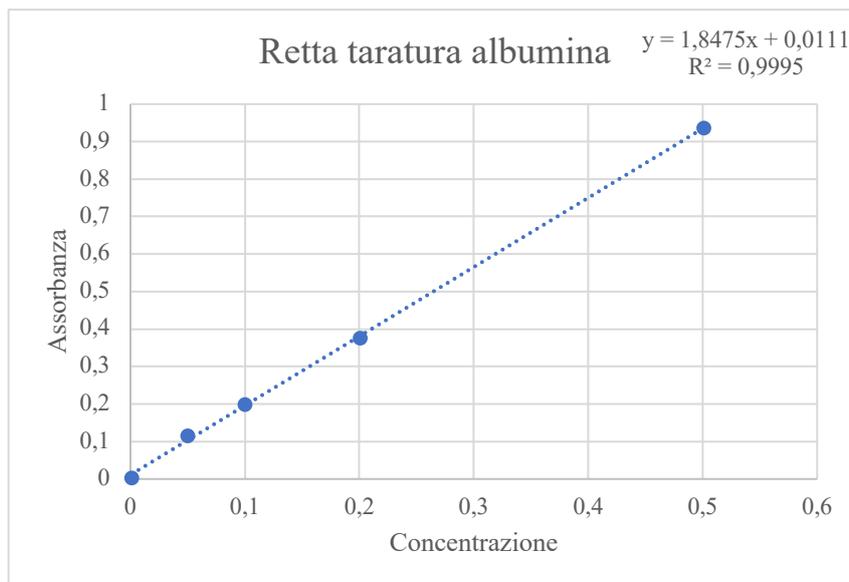


Grafico 7 Retta di taratura dell'albumina pH7

<b>RETTA TARATURA</b>			
Standard	V prelevato madre [ml]	Concentrazione standard [mg/ml]	Assorbanza
1	1,5	0,502	1,025
2	1,2	0,4016	0,876
3	0,9	0,3012	0,764
4	0,6	0,2008	0,509
5	0,3	0,1004	0,263
6	0,15	0,0502	0,13
7	0,03	0,01004	-0,004

Tabella 7 Dati per retta di taratura a pH10

Di seguito (Grafico 8) è riportato il grafico con l'equazione della retta di taratura utilizzata nel corso delle prove. È stato rimosso dal grafico e dal calcolo dell'equazione della retta interpolante lo standard 3 poiché si discostava dall'andamento generale della retta abbassandone la precisione nell'interpolazione.

Per conoscere la concentrazione dell'enzima così com'è presente nella confezione sono state fatte delle prove diluendo lo stesso con diversi rapporti di diluizione al fine di rientrare nel range di misura affidabile della retta di taratura come descritto di seguito: è stato diluito l'enzima da analizzare in modo da avere una concentrazione dello stesso di circa 0,5mg/ml (dato ricavato dalla formula inversa della retta di taratura). Miscelando 0,6ml di enzima puro in 49,4ml di buffer a pH10 e misurando il valore di assorbanza si è ottenuto un valore che variava leggermente (le misure, infatti, sono molto sensibili anche a piccole variazioni) in base ai diversi campioni preparati; tuttavia, il valor medio trovato è 0,4836mg/ml. Questo valore è stato ottenuto attraverso la diluizione dell'enzima in rapporto 1:83 (rapporto trovato sapendo la quantità di enzima utilizzato, 0,6ml, in un matraccio da 50ml). Moltiplicando quindi il valore di concentrazione del campione diluito per il fattore di diluizione si trova che la concentrazione di enzima fornito dal venditore è di circa 42 mg/ml.

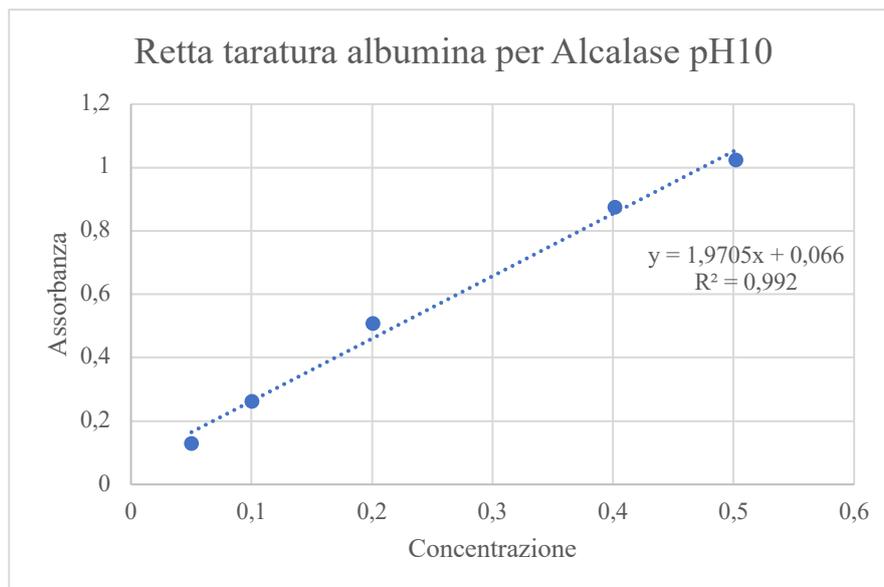


Grafico 8 Retta di taratura dell'albumina pH10

### 3.2.2 Quantità enzima immobilizzato

Per le prove di immobilizzazione si riportano i risultati ottenuti attraverso lo studio dei valori di assorbanza delle soluzioni prima e dopo l'immobilizzazione che, si ricorda, è avvenuta in 5h a temperatura ambiente agitando il materiale che funge da supporto in una soluzione di alcalase mantenendo un rapporto iniziale di  $\text{mg}_{\text{Alcalase}}/\text{g}_{\text{supporto}}$  pari a 10.

Assorbanza	Biochar	Biochar attivato	Biochar funzionalizzato	Biochar attivato funzionalizzato
Test 1	0,244	0	0,235	0,150
Test 2	0,242	0,078	0,207	0,077
Test 3	0,205	0,105	0,205	0,198

Tabella 8 Valori di assorbanza soluzione enzimatica dopo test di immobilizzazione

I valori di assorbanza della tabella riportata sopra devono essere confrontati rispetto al valore di assorbanza della soluzione iniziale (entrambi i valori sono direttamente legati al valore di concentrazione di enzima nella soluzione) che, nel caso dei primi due materiali, è 0,286 mentre per i materiali funzionalizzati è 0,275. Questo perché la soluzione è stata ripreparata in quanto, dopo le prove di immobilizzazione del primo giorno, non c'era soluzione a sufficienza per le successive. Anche se sono state preparate con le stesse diluizioni, le soluzioni, mostrano leggere differenze. Questo può essere dovuto a imprecisioni in fase di preparazione delle stesse e a incertezze legate alle misurazioni. Sono comunque valori molto vicini quindi si considerano accettabili entrambe le prove.

Nella pagina seguente è riportato un grafico con i tassi di assorbimento dei materiali presi in esame e con le deviazioni standard associate alle misurazioni ottenute.

Come si può notare dall'istogramma i tassi di adsorbimento sono differenti in base ai trattamenti effettuati sul materiale di partenza. Come accennato in precedenza è da tener presente che la soluzione di partenza non contiene precisamente la stessa quantità di enzima, nello specifico nella soluzione utilizzata per le prime due prove, complessivamente, sono

contenuti 1,116mg di enzima mentre nella seconda ne sono contenuti 1,061mg. Per dare un'idea più chiara della quantità dell'enzima immobilizzato si è pertanto calcolata la resa di immobilizzazione che da un risultato in percentuale.

Prendendo in esame i materiali non funzionalizzati, si nota una grande differenza tra il materiale attivato e il non attivato. Una maggiore superficie specifica, un maggior volume dei pori e la presenza di differenti gruppi funzionali ha permesso di ottenere una resa di immobilizzazione pari a 92,3% dell'enzima presente inizialmente. Tale valore nel caso del biochar non attivato è limitato al 25,3%.

Per quanto riguarda invece il materiale soggetto ai trattamenti di funzionalizzazione, si nota un aumento di enzima immobilizzato sulla superficie nel caso del biochar non sottoposto ai processi di attivazione. Infatti, considerando il valore iniziale di enzima presente in soluzione, la resa di immobilizzazione in questo caso è stata del 28,4%. Non si possono fare le stesse considerazioni per quanto riguarda il materiale attivato e funzionalizzato, su di esso è stato assorbito il 62,5% dell'enzima inizialmente presente in soluzione. In quest'ultimo caso però, come si può osservare dal grafico, le barre di errore legate al valore della deviazione standard sono più estese rispetto ai casi precedenti, indice del fatto che i dati potrebbero essere poco accurati se comparati ai precedenti. Pertanto, nel caso in cui fossimo nella condizione di maggiore scostamento superiore dal valore medio, i due valori sarebbero paragonabili.

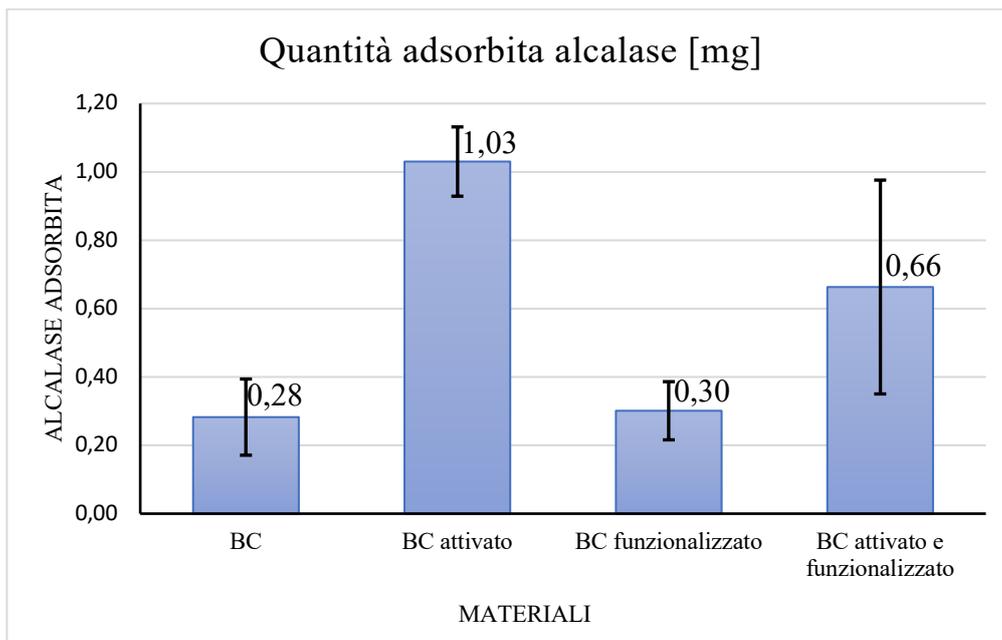


Grafico 9 Istogramma quantità adsorbita di enzima

È comunque importante ribadire che i valori legati alla quantità di enzima immobilizzato sono importanti ma non forniscono indicazioni su quanto esso sia ancora attivo. Può infatti accadere che tra supporto e enzima si creino numerosi legami che immobilizzano quest'ultimo ma se essi vincolano le deformazioni necessarie per il funzionamento dell'enzima, allora, esso non sarà più in una forma attivata. In alcuni studi [36] sono state condotte prove con diverse condizioni iniziali per comprendere l'effetto di diverse concentrazioni di enzimi e diversi rapporti enzima/supporto ed è emerso da tali studi che, incrementando la concentrazione degli enzimi in soluzione attraverso l'uso di maggiori volumi o di soluzioni maggiormente concentrate, si raggiungono delle concentrazioni di saturazione, ovvero anche aumentando la concentrazione dell'enzima non ci saranno notevoli differenze nella quantità dello stesso che si immobilizza sul supporto. Va condotto uno studio

approfondito sulle condizioni ottimali per l'immobilizzazione ma queste, non necessariamente, coincidono con le condizioni ottimali per il funzionamento dell'enzima. Ad esempio, in accordo con dati trovati in letteratura, il pH ottimale per il funzionamento dell'alcalase è in prossimità del valore 8,5; nel presente studio si è optato, in fase di immobilizzazione, per un buffer carbonato a pH 10 per soddisfare le esigenze del supporto.

È comunque da tenere in considerazione che le interazioni che si vengono a creare nel caso dell'enzima immobilizzato su un supporto non funzionalizzato e uno sottoposto ai trattamenti di funzionalizzazione cambiano di molto. Nel primo caso a prevalere è l'effetto di interazioni elettrostatiche, forze di legame intrinsecamente più deboli e variabili in base alle condizioni operative in cui si trovano supporto ed enzima da immobilizzare (primo fattore fra tutti che ha un effetto importante in questo caso è il pH). Nel caso di un supporto funzionalizzato intervengono modifiche superficiali che portano alla comparsa (e scomparsa) di gruppi funzionali superficiali, i quali, hanno sia un ruolo nelle interazioni elettrostatiche che nella formazione di legami veri e propri con l'enzima. Queste interazioni influenzeranno non solo la quantità di enzima che viene immobilizzata sul supporto ma anche l'attività dello stesso poiché in base alla rigidità dell'enzima, all'orientazione e ad altri fattori si possono notare differenze nei risultati.

	BC	BC attivato	BC funzionalizzato	BC attivato e funzionalizzato
Rese immobilizzazione [valore %]	25,30	92,27	28,39	62,52

Tabella 9 Valori rese di immobilizzazione

Considerando i dati di immobilizzazione e confrontandoli con i risultati di studi operati in condizioni analoghe, trovati in letteratura, [36] si può affermare che per ogni materiale utilizzato nel presente studio la resa di immobilizzazione è paragonabile. Nella maggior parte degli studi sono stati effettuati esperimenti a diverse concentrazioni iniziali di enzima e diversi tempi di miscelazione, nel migliore dei casi nello studio di J. Zhao et al. [36] la resa di immobilizzazione ottenuta è stata del 40% utilizzando l'alcalase su un supporto di origine organica differente rispetto a quello utilizzato nello studio che si sta descrivendo (è stato utilizzato come materiale di partenza per la produzione di biochar il guscio dei semi di *Cinnamomum camphora*) e anche le condizioni di processo per la pirolisi e l'attivazione e funzionalizzazione non erano le stesse.

### 3.3 Risultati attività enzimatica

#### 3.3.1 Retta di taratura per attività enzimatica

Il risultato è la retta di taratura riportato nel grafico che segue. Il fattore  $R^2$  particolarmente vicino all'unità indica che l'equazione dell'interpolante è affidabile. In questo caso, come descritto nel capitolo delle procedure, non è stato usato il buffer carbonato pH10.

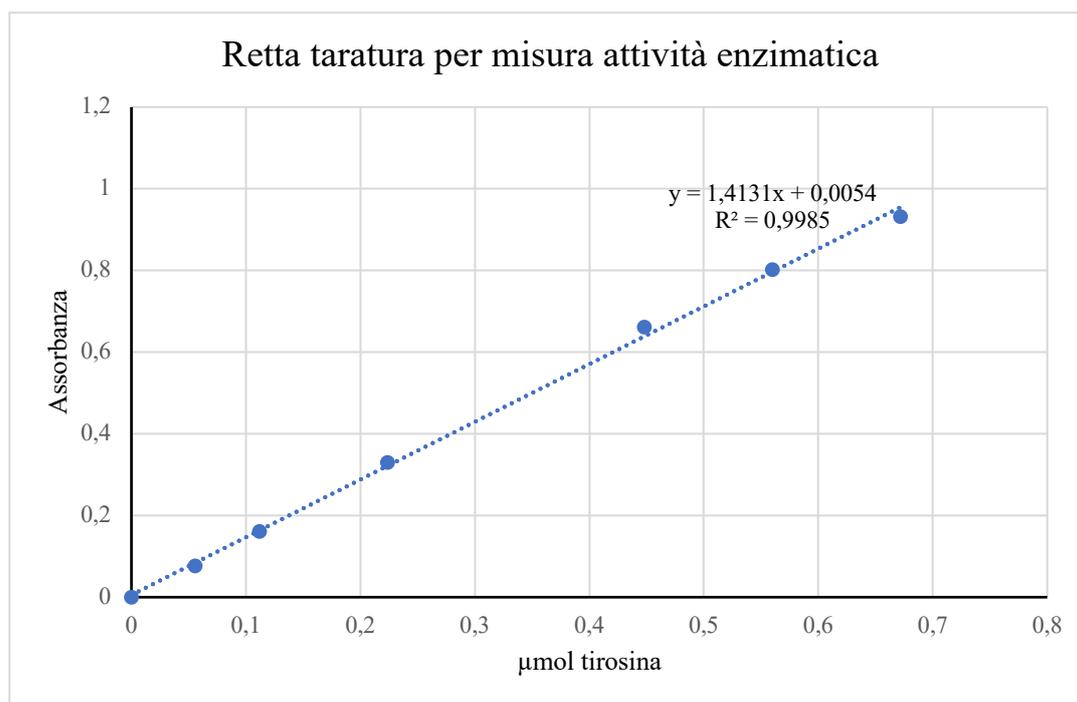


Grafico 10 Retta taratura L-Tirosina

### 3.3.2 Risultati attività enzimatica enzima diluito

I risultati di assorbanza legati a questa analisi sono stati utilizzati nella formula inversa dell'equazione della linea di tendenza della retta di taratura. Essi hanno fornito un valore medio di  $\mu\text{mol}$  di tirosina pari a  $0,505 \mu\text{mol}$  con una deviazione standard di  $0,0276$ , indice del fatto che i valori sono affidabili poiché lo scostamento dal valore medio è contenuto.

Test	Assorbanza	Concentrazione tirosina [ $\mu\text{mol}$ ]	U [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ]	U/mg <sub>enzima</sub> [ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}_{\text{enzima}}$ ]
T1	0,706	0,496	0,0496	2,36
T2	0,762	0,535	0,0535	2,55
T3	0,687	0,482	0,0482	2,30

Tabella 10 Dati da test attività enzimatica enzima diluito

Se si confrontano i risultati di attività calcolati con il saggio di Folin nel caso dell'alcalase diluita con attività di proteasi ritrovabili in letteratura, si nota che gli ordini di grandezza sono confrontabili, ad esempio, con l'enzima tripsina che è stato usato come standard nello studio di C.G. Kusuma et al. [37], attraverso il saggio di attività di Folin è stata valutata un'attività pari a  $0,101 \mu\text{mol}/\text{min}$  mentre, nello stesso studio, si è valutata l'attività proteolitica del lattice della pianta *Plumeria alba L. natant* che risulta pari a  $0,0217$ .

Tali valori saranno presi come standard, infatti l'enzima non immobilizzato e disciolto in un buffer con un pH che non causi deformazioni conformazionali lavora in condizioni ottimali. Proprio per questo motivo i confronti riguardanti l'attività saranno fatti su tali valori. Si sottolinea inoltre che gli studi citati e lo studio per il presente lavoro di tesi hanno seguito il protocollo di Folin per la misura dell'attività enzimatica che prevede la dissoluzione della caseina in una soluzione a pH 7,5. Questo valore di pH può essere più o meno vicino al valore ottimale associato all'enzima analizzato, piccoli scostamenti possono infatti far sì che si

allontanino dalla superficie degli enzimi gruppi  $H^+$  o  $OH^-$  cercando di raggiungere l'equilibrio elettrostatico. Una conseguenza di ciò sono delle modifiche nella geometria e di conseguenza nella capacità di catalizzare reazioni.

### 3.3.3 Risultati attività enzimatica enzima immobilizzato

I risultati che quantificano l'attività dell'enzima immobilizzato sul supporto sono frutto di calcoli analoghi al caso con l'enzima diluito. La maggiore differenza di cui si è dovuto tenere conto è legata al fatto che la massa di enzima immobilizzato era differente per i diversi materiali.

Per ricondursi alle stesse condizioni operative nel caso dei quattro differenti supporti utilizzati sono stati fatti dei conti a partire dai risultati delle prove di immobilizzazione. Sapendo che le rese di immobilizzazione non sono le stesse per i diversi materiali e conoscendo la quantità di enzima per la massa unitaria di supporto sono state calcolate le quantità necessarie di supporto (sul quale è immobilizzata una certa quantità di enzima).

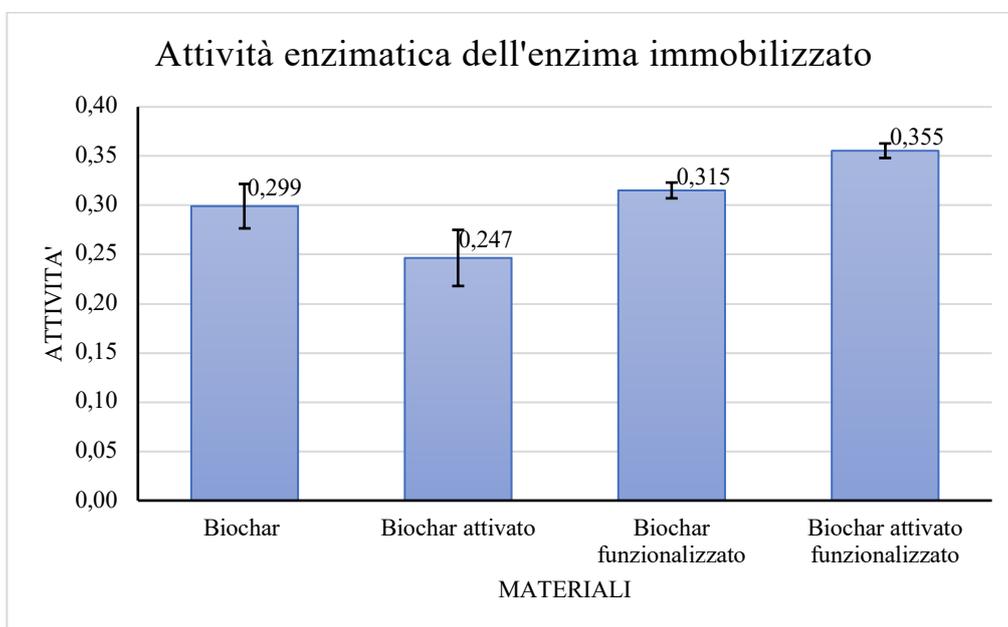


Grafico 11 Andamento attività enzimatica Alcalase immobilizzato

Oltre alla valutazione dell'attività caso per caso è stata valutata l'efficienza di immobilizzazione attraverso il rapporto dei valori di attività dell'enzima diluito e dell'immobilizzato. In linea di massima si nota un lieve aumento dell'attività quando l'enzima è immobilizzato sul supporto funzionalizzato. Questo può essere motivato dal fatto che l'immobilizzazione sul supporto funzionalizzato prevede la formazione di veri e propri legami chimici dovuti alla presenza di gruppi presenti grazie ai trattamenti con la glutaraldeide. Infatti, i trattamenti di funzionalizzazione del supporto sono realizzati con lo scopo di aumentare la resa di immobilizzazione e mantenere l'enzima attivo, quando immobilizzato. Questo grazie al ruolo dei gruppi  $NH$  presenti in seguito al trattamento con etilendiammina che svolgono azioni elettrostatiche che attraggono gli enzimi e grazie al ruolo della glutaraldeide che crea veri e propri legami una volta che l'enzima è a distanze ridotte.

	Efficienza di immobilizzazione
Biochar	12 %
Biochar attivato	10 %

Biochar funzionalizzato	13 %
Biochar attivato funzionalizzato	15 %

Tabella 11 Valori dell'efficienza di immobilizzazione dei diversi materiali

In alcuni studi le condizioni di processo sono state fatte variare, un parametro molto importante nel caso della valutazione dell'attività enzimatica e che può avere grandi effetti anche con piccoli scostamenti è il valore di pH. Nello studio [36] l'enzima alcalase ha mostrato una efficienza di immobilizzazione pari al 54,08% ad un pH 8. Questo dato preso come confronto si discosta molto dai risultati ottenuti nello studio, tuttavia, sebbene l'enzima utilizzato sia il medesimo, il supporto è stato prodotto da materie di partenza differenti in condizioni di pirolisi analoghe ma non identiche e i trattamenti di attivazione e funzionalizzazione sono stati condotti in maniera differente da quelli in questo studio. Tutte queste considerazioni possono giustificare la differenza marcata tra i risultati dei due studi.

È noto che, associate anche a piccole variazioni nei valori di pH del buffer, l'enzima possa subire pesanti variazioni in termini della sua attività. Questo è dovuto alla distribuzione di cariche in microambienti. Un eccesso di ioni -OH nel buffer può rapidamente deprotonare l'enzima causando modifiche nella sua geometria e abbassandone l'attività. Caso analogo si ha quando la concentrazione di -H<sup>+</sup> è elevata, ma il gruppo ossidrilico è liberato dall'enzima.

Come già accennato nel caso dell'enzima diluito, nel presente caso studio la misura dell'attività enzimatica è stata eseguita ad un valore di pH pari a 7,5. Tuttavia, l'immobilizzazione è avvenuta a pH pari a 10. Queste condizioni possono avere causato deformazioni nell'enzima.

## 4 Conclusioni

In questo studio sono state condotte delle misurazioni su biochar prodotti da lolla di riso attraverso una pirolisi lenta. Successivamente il biochar è stato in parte attivato ponendolo a contatto con una base forte (KOH) e in parte mantenuto inalterato. Questi due materiali sono poi stati in parte funzionalizzati. I trattamenti svolti hanno la capacità di modificare la superficie in termini morfologici, nella presenza di gruppi funzionali e sotto altri aspetti. I materiali preparati sono stati in seguito utilizzati in prove di immobilizzazione enzimatica per contatto. Dai risultati è emerso che l'immobilizzazione su tutti i materiali è buona, il risultato migliore si è ottenuto nel caso del biochar sottoposto ai soli trattamenti di attivazione dove la quasi totalità dell'enzima si è immobilizzato. Successivamente i materiali con l'enzima fissato al di sopra di essi sono stati utilizzati per misurare l'attività enzimatica. È stata misurata anche l'attività enzimatica dell'enzima diluito in modo da avere un dato di confronto. Da queste misurazioni è emersa una riduzione notevole dell'attività che in media ha raggiunto valori pari a un decimo del valore misurato con l'enzima diluito.

Come risulta dai risultati ottenuti nel presente studio, c'è margine di miglioramento soprattutto per quanto riguarda l'aumento dell'attività enzimatica dell'enzima fissato sul supporto. Tuttavia, diversi studi mostrano come, attraverso l'uso di questo genere di tecnologie si possano ottenere ottimi risultati in diversi ambiti, principalmente se gli enzimi immobilizzati sono utilizzati in processi di estrazioni enzimatiche o svolgono il ruolo di catalisi di reazioni.

È possibile, infatti, recuperare l'enzima in maniera più agevole se esso è utilizzato immobilizzato su un supporto solido nella catalisi di estrazioni enzimatiche. Aumentando in questo modo le rese dei processi nel quale essi sono utilizzati e anche l'economia del processo in quanto l'enzima recuperato può essere riutilizzato. Il recupero può essere effettuato in diverse modalità e le caratteristiche del supporto possono avere una certa influenza sulla facilità con cui l'enzima viene recuperato. Soluzioni come l'utilizzo di centrifughe, la formazione di pellet oppure l'utilizzo di un supporto con proprietà magnetiche possono agevolare il recupero dell'enzima.

I risultati riguardanti l'immobilizzazione enzimatica sul supporto sono promettenti. Nel caso del biochar attivato la resa di immobilizzazione ha superato il 90% tuttavia l'attività enzimatica dell'enzima associato a questo supporto era la più bassa in assoluto. Da questo materiale si comprende come immobilizzazione e attività siano abbastanza indipendenti.

I valori più elevati ottenuti dalle misure dell'attività enzimatica sono quelli forniti da enzimi immobilizzati sui supporti funzionalizzati. La funzionalizzazione con glutaraldeide prevede formazioni di legami covalenti tra la glutaraldeide sul supporto e l'enzima. Tuttavia, anche in questa tecnica ci sono interazioni elettrostatiche, almeno in una fase iniziale di avvicinamento dell'enzima al supporto, attratto dai gruppi NH della etilendiammina. Queste interazioni hanno un pesante impatto in termini di modifiche della geometria dell'enzima.

Come prospettiva futura su questa tecnologia emergente si potrebbero valutare le migliori condizioni operative per ciascun prodotto in termini di rapporto enzima/supporto, di pH (in fase di immobilizzazione e di ambiente di reazione), temperatura, tempo di miscelazione e concentrazione iniziale dell'enzima. Il fatto che l'enzima si sia immobilizzato quasi completamente sul biochar attivato è stato un buon risultato ma indice del fatto che quelle utilizzate non erano le condizioni che portavano alla saturazione dei punti di ancoraggio di tale materiale. Inoltre, la riduzione dell'attività enzimatica a un decimo del valore iniziale indica che le interazioni elettrostatiche dovute al pH hanno causato modifiche

importanti all'enzima rendendolo molto meno attivo. I valori di pH usati come buffer nel quale sciogliere la caseina non erano distanti dal valore di pH ottimale per l'enzima. Lo stesso valore di pH è stato ricercato nella produzione del buffer nel quale l'enzima è stato diluito 1:2000. La vicinanza alle condizioni ottimali ha mostrato che l'enzima diluito è attivo e la sua attività era molto elevata se confrontata con quella dell'Alcalase immobilizzata. Ritengo pertanto che il valore di pH utilizzato nell'immobilizzazione abbia comportato modifiche alla geometria dell'enzima causando una riduzione della sua attività; tuttavia, si è mostrato particolarmente efficiente nell'immobilizzazione. La scelta delle condizioni operative è comunque stata vincolata da caratteristiche del supporto da utilizzare e dall'enzima stesso. L'enzima ha comunque mostrato una certa attività e attraverso prove a pH differenti si può comprendere l'andamento delle grandezze misurate.

Sulla base di quanto descritto nel paragrafo precedente, si ribadisce l'importanza nell'approfondimento di questa tecnologia. È infatti possibile ottenere un enzima utilizzabile in diverse condizioni operative, più stabile anche se distanziato dalle condizioni ottimali attraverso una buona fase di immobilizzazione che può sfruttare tecniche come il *multipoint attachment* oltre a questo è possibile rimuovere l'enzima in maniera rapida dall'ambiente di reazione facendo terminare la reazione senza sottoporre a stress termici i prodotti (infatti se l'enzima è disciolto in fase liquida per terminare la sua reazione occorre denaturare l'enzima riscaldando il tutto). È inoltre possibile ottenere supporti con diversi tipi di enzimi trattati con lo scopo di trattare delle materie di partenza con caratteristiche ben precise, ricreando una sorta di catena metabolica per produrre prodotti specifici da substrati che altrimenti non sarebbero trattabili in un solo step di reazione.

Va comunque tenuto presente che gli enzimi sono in grado di adattarsi a molte situazioni e sono utilizzabili su diversi substrati. Una prova di ciò è il largo impiego di enzimi della categoria lipasi in diverse soluzioni. Agli albori dell'utilizzo di questa tecnologia si apprezzava maggiormente l'elevata selettività nelle reazioni catalizzate dagli enzimi, allo stato attuale a venir sfruttata è il vasto range di applicazione di tali biocatalizzatori. Sebbene le condizioni operative non siano quelle ottimali le reazioni avvengono con un buon grado di conversione.

In ottica di sviluppo di tale tecnologia per un utilizzo in ambito industriale sarebbe opportuno anche valutare per quanto tempo l'enzima può restare attivo e l'andamento dell'attività enzimatica all'aumentare delle reazioni che sono state catalizzate dall'enzima. Inoltre, un problema che può verificarsi nel caso di enzimi immobilizzati è il distaccamento degli enzimi dal supporto. Questo può causare una diminuzione dell'enzima sul supporto e una contaminazione del prodotto, inoltre si verificherà una diminuzione dell'attività con il procedere del numero di impieghi dell'enzima immobilizzato poiché presente in quantità sempre inferiori sulla sua superficie.

Come visto in questo studio la tecnologia dell'immobilizzazione enzimatica è ancora nelle sue fasi emergenti, ci sono ottime prospettive di crescita e, una volta ottimizzata, il suo impiego potrà soddisfare le esigenze di molti processi produttivi. L'uso di enzimi, infatti, è connesso a produzioni meno energivore e con selettività maggiori. Da quando sono iniziati gli studi e gli impieghi degli enzimi per soddisfare diverse esigenze si è giunti a diverse conclusioni che hanno reso la loro produzione più economica e il loro impiego sempre più su vasta scala.

## 5 Riferimenti bibliografici

- [1] Attualità Parlamento europeo, 2023, Economia circolare: definizione, importanza e vantaggi, disponibile online: <https://www.europarl.europa.eu/news/it/headlines/economy/20151201STO05603/economia-circolare-definizione-importanza-e-vantaggi>
- [2] Centro Regionale di Informazione delle Nazioni Unite, Obiettivi per lo sviluppo sostenibile, disponibile online: <https://unric.org/it/agenda-2030/>
- [3] Nyakuma, Bemgba B. et al. “Bibliometric Analysis of the Research Landscape on Rice Husks Gasification (1995–2019).” *Environmental science and pollution research international* 28.36 (2021): 49467–49490. [DOI: 10.1007/s11356-021-15761-x]
- [4] Korotkova T. G, Ksandopulo S. J, Donenko A. P, Bushumov S. A, Danilchenko A. S. Physical Properties and Chemical Composition of the Rice Husk and Dust. *Orient J Chem* 2016;32(6) [DOI : <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/320644>]
- [5] Pandey, Deepshikha, Achlesh Daverey, and Kusum Arunachalam. “Biochar: Production, Properties and Emerging Role as a Support for Enzyme Immobilization.” *Journal of cleaner production* 255 (2020): 120267-120267. Web. [DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.120267]
- [6] Massimo Valagussa, “Stato della filiera del biochar in Italia: produzione, quadro normativo e opportunità”
- [7] Cha, Jin Sun et al. “Production and Utilization of Biochar: A Review.” *Journal of industrial and engineering chemistry (Seoul, Korea)* 40 (2016): 1–15. Web. [DOI: 10.1016/j.jiec.2016.06.002]
- [8] Abu El-Rub, Z., E.A. Bramer, and G. Brem. “Experimental Comparison of Biomass Chars with Other Catalysts for Tar Reduction.” *Fuel (Guildford)* 87.10–11 (2008): 2243–2252. Web. [DOI: 10.1016/j.fuel.2008.01.004]
- [9] Dehkhoda, Amir Mehdi, Alex H. West, and Naoko Ellis. “Biochar Based Solid Acid Catalyst for Biodiesel Production.” *Applied catalysis. A, General* 382(2) (2010): 197–204. Web. [DOI: 10.1016/j.apcata.2010.04.051]
- [10] Tacias-Pascacio, Veymar G. et al. “Use of Alcalase in the Production of Bioactive Peptides: A Review.” *International journal of biological macromolecules* 165.Pt B (2020): 2143–2196. Web. [DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060]
- [11] Yi Liu, Deepika Dave “Beyond processing waste: Extraction of oil from Atlantic salmon (*Salmo salar*) by-products using immobilized Alcalase on chitosan-coated magnetic nanoparticles” *Aquaculture* Volume 548, Part 1, (2022), 737546. [<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737546>]
- [12] Hudson robotics, Exploring the Working Principles of pH Meters: How Do They Measure pH?, disponibile online: <https://hudsonrobotics.com/exploring-the-working-principles-of-ph-meters-how-do-they-measure-ph/#:~:text=The%20glass%20membrane%20in%20a,the%20pH%20of%20the%20solution.>
- [13] Technology Networks Analysis & Separations, UV-Vis Spectroscopy: Principle, Strengths and Limitations and Applications, disponibile online: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>

- [14] Polytechnic of Turin, Applied Sciences and Technologies Department, Field emission SEM, consultabile online: [https://areeweb.polito.it/ricerca/carbongroup/fac\\_fesem.html](https://areeweb.polito.it/ricerca/carbongroup/fac_fesem.html)
- [15] Cristiano, Elena et al. “A Comparison of Point of Zero Charge Measurement Methodology.” *Clays and clay minerals* 59.2 (2011): 107–115. Web. [DOI: 10.1346/CCMN.2011.0590201]
- [16] International standard ISO 9277 Determination of the specific surface area of solids by gas adsorption — BET method disponibile online: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/71014/9410fd032fa44c459a550d78c14aa4fc/ISO-9277-2022.pdf>
- [17] LibreText chemistry, BET surface area analysis of nanoparticles, disponibile online: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Physical\\_Methods\\_in\\_Chemistry\\_and\\_Nano\\_Science\\_%28Barron%29/02%3A\\_Physical\\_and\\_Thermal\\_Analysis/2.03%3A\\_BET\\_Surface\\_Area\\_Analysis\\_of\\_Nanoparticles](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_%28Barron%29/02%3A_Physical_and_Thermal_Analysis/2.03%3A_BET_Surface_Area_Analysis_of_Nanoparticles)
- [18] Virginia tech, BET, disponibile online: <https://nanoearth.ictas.vt.edu/access/selector/bet.html>
- [19] Measurelab, BET, disponibile online <https://measurlabs.com/methods/brunauer-emmett-teller-bet-analysis/#:~:text=BET%20analysis%20is%20an%20analytical,given%20in%20m%2Fg>.
- [20] Hidayat et al. “Analysis of rice husk biochar characteristics under different pyrolysis temperature” 2023 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 1201 012095 [DOI:10.1088/1755-1315/1201/1/012095]
- [21] Tag, Asli Toptas et al. “Effects of Feedstock Type and Pyrolysis Temperature on Potential Applications of Biochar.” *Journal of analytical and applied pyrolysis* 120 (2016): 200–206. Web. [DOI: 10.1016/j.jaap.2016.05.006]
- [22] Chen, Baoliang, Dandan Zhou, and Lizhong Zhu. “Transitional Adsorption and Partition of Nonpolar and Polar Aromatic Contaminants by Biochars of Pine Needles with Different Pyrolytic Temperatures.” *Environmental science & technology* 42.14 (2008): 5137–5143. Web. [DOI: 10.1021/es8002684]
- [23] Kolar, Praveen, and Han Jin. “Baseline Characterization Data for Raw Rice Husk.” *Data in brief* 25 (2019): 104219–104219. Web. [DOI: 10.1016/j.dib.2019.104219]
- [24] Yang, Yuhuan et al. “ZnO Nanoparticles Loaded Rice Husk Biochar as an Effective Adsorbent for Removing Reactive Red 24 from Aqueous Solution.” *Materials science in semiconductor processing* 150 (2022): 106960-. Web. [DOI: 10.1016/j.mssp.2022.106960]
- [25] Zhang, Kaikai et al. “Characterization of Biochar Derived from Rice Husks and Its Potential in Chlorobenzene Degradation.” *Carbon (New York)* 130 (2018): 730–740. Web. [DOI: 10.1016/j.carbon.2018.01.036]
- [26] Saeed, Anwar et al. “Production and Characterization of Rice Husk Biochar and Kenaf Biochar for Value-Added Biochar Replacement for Potential Materials Adsorption.” *Ecological Engineering & Environmental Technology* 22.1 (2021): 1–8. Web. [DOI: 10.12912/27197050/132099]
- [27] Li, J. et al. “Volatile Organic Compounds Analysis and Characterization on Activated Biochar Prepared from Rice Husk.” *International journal of environmental science and technology (Tehran)* 16.12 (2019): 7653–7662. Web. [DOI: 10.1007/s13762-019-02219-4]

- [28] Castillo, Jimmy et al. “Synthesis of Nanocomposites SiO<sub>2</sub>@Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, SiO<sub>2</sub>@ZnO, and SiO<sub>2</sub>@CuO from Rice Husks: Spectroscopy and Optical Properties.” *Applied physics. A, Materials science & processing* 128.2 (2022): n. pag. Web. [DOI: 10.1007/s00339-021-05247-5]
- [29] Hailing Liu and Hoyong Chung, “Self-Healing Properties of Lignin-Containing Nanocomposite: Synthesis of Lignin-graft-poly(5-acetylaminopentyl acrylate) via RAFT and Click Chemistry” *Macromolecules* (2016) [DOI: 10.1021/acs.macromol.6b01028]
- [30] L M Xie et al 1991 *J. Phys.: Condens. Matter* 3 8519
- [31] M. N. Chai, M. I. N. Isa, “The Oleic Acid Composition Effect on the Carboxymethyl Cellulose Based Biopolymer Electrolyte”, *Journal of Crystallization Process and Technology*, 2013, 3, 1-4 [DOI:10.4236/jcpt.2013.31001]
- [32] Zhong, Linlin, and Kyusik Yun. “Graphene Oxide-Modified ZnO Particles: Synthesis, Characterization, and Antibacterial Properties.” *International journal of nanomedicine* 10 Spec Iss.Spec Iss (2015): 79–92. Web. [DOI: 10.2147/IJN.S88319]
- [33] Anyaporn Boonmahitthisud, “Preparation and Characterization of Epoxidized Natural Rubber and Epoxidized Natural Rubber/Carboxylated Styrene Butadiene Rubber Blends”, *Journal of Metals, Materials and Minerals, Vol.25 No.1 pp.27-36, 2015* [DOI: 10.14456/jmmm.2015.4]
- [34] Shenjun Qin et al., “Long-term, low temperature simulation of early diagenetic alterations of organic matter: A FTIR study” *ENERGY EXPLORATION & EXPLOITATION*, Volume 28, Number 5, 2010 pp. 365-376
- [35] Chang, Myung Chul, and Junzo Tanaka. “FT-IR Study for Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposite Cross-Linked by Glutaraldehyde.” *Biomaterials* 23.24 (2002): 4811–4818. Web. [DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00232-6]
- [36] Zhao, Junxin et al. “Green Synthesis of Polydopamine Functionalized Magnetic Mesoporous Biochar for Lipase Immobilization and Its Application in Interesterification for Novel Structured Lipids Production.” *Food chemistry* 379 (2022): 132148–132148. Web. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132148]
- [37] Kusuma, C.G. et al. “Thrombin- and Plasmin-like and Platelet-Aggregation-Inducing Activities of Plumeria Alba L. Latex: Action of Cysteine Protease.” *Journal of ethnopharmacology* 273 (2021): 114000–114000. Web. [DOI: 10.1016/j.jep.2021.114000]

## 6 Indice delle figure, delle tabelle e dei grafici

Figura 1 Schema di reazione pirolizzatore

Figura 2 Tipica configurazione industriale per produzione biochar

Figura 3 Andamento energia di attivazione di una reazione catalizzata

[<https://www.worthington-biochem.com/tools-resources/intro-to-enzymes/enzyme-kinetics-energy-levels>]

Figura 4 Idrolisi legame peptidico

Figura 5 Procedura attivazione biochar

Figura 6 Aspetto biochar non attivato

Figura 7 pHmetro utilizzato nelle misure

Figura 8 Schema funzionamento spettrofotometro

[<https://www.smacgigworld.com/blog/design-and-working-uv-vis-spectrophotometer.php>]

Figura 9 Equazioni per il calcolo dell'assorbanza [13]

Figura 10 Spettrofotometro usato per le misurazioni

Figura 11 Immagine della postazione analizzatore elementare

Figura 12 Schema funzionamento BET [<https://andyjconnelly.wordpress.com/2017/03/13/bet-surface-area/>]

Figura 13 Apparecchiatura utilizzata per BET

Figura 14 Principio di funzionamento riflettanza totale

[DOI:[10.2174/2213385203666150219231836](https://doi.org/10.2174/2213385203666150219231836)]

Figura 15 Apparecchiatura utilizzata per BET

Figura 16 Aspetto proteine coagulate dopo aggiunta acido

Figura 17 Aspetto dei test per misura attività enzimatica Alcalase diluito 1:2000

Figura 18 Essiccatore per biochar con enzima

Figura 19 Immagini FESEM lolla di riso non trattata

Figura 20 Immagini FESEM biochar

Figura 21 Immagini FESEM biochar attivato

Figura 22 Immagini FESEM carbone attivo

Tabella 1 Classi di enzimi

Tabella 2 Quantità di BC pesata per i test di immobilizzazione

Tabella 3 Risultati analisi elementare ottenuti nel laboratorio FERMAN

Tabella 4 Risultati analisi elementare dallo studio [20]

Tabella 5 Dati BET misurati

Tabella 6 Dati BET letteratura

Tabella 7 Dati per retta di taratura a pH10

Tabella 8 Valori di assorbanza soluzione enzimatica dopo test di immobilizzazione

Tabella 9 Valori rese di immobilizzazione

Tabella 10 Dati da test attività enzimatica enzima diluito

Tabella 11 Valori dell'efficienza di immobilizzazione dei diversi materiali

Grafico 1 Valutazione pzc carbone attivo

Grafico 2 Valutazione pzc BC da rice husk

Grafico 3 Spettro IR della lolla di riso non trattata

Grafico 4 Spettro IR confronto BC attivato e non attivato

Grafico 5 Spettro IR biochar funzionalizzato

Grafico 6 Spettro IR biochar attivato e funzionalizzato

Grafico 7 Retta di taratura dell'albumina pH7

Grafico 8 Retta di taratura dell'albumina pH10

Grafico 9 Istogramma quantità adsorbita di enzima

Grafico 10 Retta taratura L-Tirosina

Grafico 11 Andamento attività enzimatica Alcalase immobilizzato