

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

Studio di enzimi immobilizzati per la valorizzazione di acidi carbossilici



Relatori

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

Candidato

Andrea Bergamelli

Dicembre 2021

Indice

1. Introduzione	4
1.1.1 Svolgimento lavoro	5
<i>1.2 Catalisi enzimatica</i>	6
1.2.1 Enzimi Studiati: ADH e AldDH.....	7
<i>1.3 Tecniche di immobilizzazione enzimatica</i>	11
1.3.1 Adsorbimento	11
1.3.2 Legame covalente.....	12
1.3.3 Intrappolamento.....	12
1.3.4 Cross-linking	13
<i>1.4 Acidi Carbossilici</i>	13
<i>1.5 Altri metodi di conversione degli acidi carbossilici</i>	15
1.5.1 Chetonizzazione	15
1.5.2 Funghi.....	15
1.5.3 Batteri	16
<i>1.6 Supporti</i>	16
Bibliografia.....	18
2. Materiali e metodi	22
<i>2.1 Sintesi MCF 0.75</i>	22
<i>2.2 Caratterizzazione supporti</i>	23
2.2.1 Analisi mediante fisisorbimento di N ₂ a -196 °C (analisi BET).....	23
2.2.2 FE-SEM.....	24
2.2.3 Funzionalizzazione supporto con gruppi amminici.....	25
2.2.4 Funzionalizzazione supporto con gruppi aldeidici	26
<i>2.3 Immobilizzazione</i>	27
2.3.1 Immobilizzazione Aldeide Deidrogenasi (AldDH).....	27
2.3.2 Immobilizzazione Alcol Deidrogenasi (ADH).....	28
2.3.3 Resa di immobilizzazione	28
<i>2.4 Misura dell'attività enzimatica</i>	29
<i>2.5 Stabilità termica</i>	29
<i>2.6 pH e Temperatura ottimale</i>	30
2.7 Reazioni.....	31
2.7.1 Analisi HSGC (Gascromatografia dello spazio di testa).....	31
2.7.2 Prove di riutilizzo	32

Bibliografia.....	33
3. Risultati	35
3.1 Caratterizzazione supporti	35
3.1.1 Analisi mediante fisisorbimento di N ₂ a -196 °C (analisi BET).....	35
3.1.2 Analisi FE-SEM	41
3.2 Attività enzimatica	43
3.3 Caratterizzazione pH e Temperatura ottimale	44
3.4 Stabilità termica	47
3.5 Reazioni	50
3.6 Riutilizzo.....	51
4.Lavori Futuri	53
5.Conclusioni.....	54
Bibliografia.....	55

1. Introduzione

Oggi giorno risulta sempre più importante favorire una transizione verso un modello di economia circolare grazie al quale convertire gli scarti dei processi come: l'anidride carbonica, la frazione organica dei rifiuti solidi urbani e altre tipologie di rifiuti come quelli agricoli o industriali, in molecole ad alto valore aggiunto in maniera sostenibile. Questa è una delle principali sfide a cui l'uomo deve rispondere per cercare di diminuire il suo impatto sul pianeta in termini di sfruttamento delle risorse e di inquinamento.

Lo scopo di questo progetto di tesi è quello di studiare la conversione di acidi carbossilici derivati dalla fermentazione anaerobica. Gli acidi carbossilici, dopo una prima fase di concentrazione e purificazione, possono essere utilizzati per produrre molecole a più alto valore aggiunto, ad esempio gli alcoli, che hanno innumerevoli applicazioni nell'industria chimica e possono essere utilizzati come combustibili, profumi, conservanti e plastificanti [1].

La digestione anaerobica (AD) è un processo naturale nel quale microrganismi degradano il materiale organico in assenza di ossigeno per produrre biogas, rappresenta un processo rinnovabile con lo scopo di convertire scarti come rifiuti alimentari, biomassa lignocellulosica o rifiuti urbani a metano ed acqua.

Il biogas è composto principalmente da CH_4 (40%-75%) e CO_2 (15%-60%) e da piccole quantità di idrogeno, azoto, ossigeno e acqua. Il processo è costituito da quattro step biologici: idrolisi dove la materia insolubile viene scissa a semplici monomeri da batteri, acidogenesi e acetogenesi converto gli zuccheri e acidi in acidi carbossilici, alcol, CO_2 e H_2 . La metanogenesi è lo step finale nel quale vengono convertiti gli acetati e l'idrogeno a biogas [34].

Anche se la produzione di biogas tramite digestione anaerobica rappresenta una soluzione rinnovabile e sostenibile, vi sono alcuni problemi legati al processo. Questi includono l'emissione di gas serra durante le operazioni di gestione, costi aggiuntivi per la raffinazione del biogas per rimuovere le impurità. Inoltre, essendo la CO_2 il secondo componente più presente, si ha una conversione del carbonio in un gas inutilizzabile andando così a ridurre l'efficienza energetica[5].

Esistono diverse tecniche per convertire gli acidi carbossilici, ad esempio tramite il processo di chetonizzazione [2] o processi biologici che utilizzano funghi[3] o batteri [4]. In questo lavoro, per la conversione degli acidi carbossilici è stata proposta una nuova strategia basata sulla catalisi enzimatica con l'utilizzo di due enzimi in serie. Nella prima fase della reazione, gli acidi carbossilici vengono ridotti ad aldeidi, utilizzando l'enzima aldeide deidrogenasi (AldDH), e quindi le aldeidi ad alcoli, utilizzando l'enzima alcol deidrogenasi (ADH) (figura 1.1).

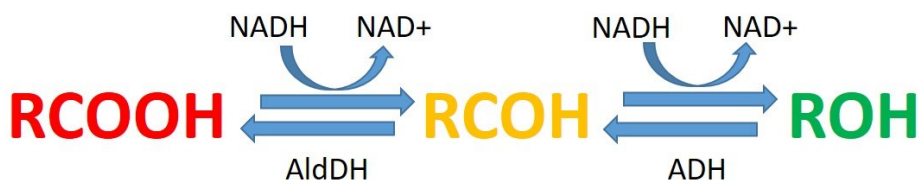


Figura 1.1 Schema reazione enzimatica, da acidi carbossilici ad alcol tramite enzimi AldDH e ADH

Entrambi gli enzimi sono stati ottenuti da *Saccharomyces cerevisiae*. Per eseguire la prima reazione è stato scelto l'enzima AldDH al posto del più utilizzato CAR (Acidi carbossilici reductasi), in quanto quest'ultimo richiede la presenza contemporanea di due cofattori, ATP e NADH per eseguire la reazione [6]. L'uso in serie con l'enzima ADH potrebbe

spostare la reazione verso destra, in quanto le aldeidi prodotte verrebbero immediatamente convertite in alcoli. Comportamento simile si riscontra nel caso della produzione di metanolo da acido formico, sebbene in questo caso venga utilizzato l'enzima formaldeide deidrogenasi [8].

Entrambi gli enzimi, utilizzano solo NADH come cofattore ed è necessaria un'alta concentrazione per ottenere elevate quantità di prodotto desiderabile. Il NADH è una molecola molto costosa ed è quindi necessario effettuare un processo di rigenerazione del cofattore per rendere il processo più sostenibile e fattibile la sua scalabilità.

A causa dell'elevato costo di produzione e purificazione degli enzimi, è fondamentale immobilizzarli per aumentare la stabilità termica e allo stesso tempo poterli recuperare e riutilizzare per più di una reazione [6].

L'immobilizzazione di questi enzimi risulta essere di fondamentale importanza se non essenziale per una possibile futura applicazione a livello industriale. Tra le varie tecniche di immobilizzazione: adsorbimento, cross-linking, intrappolamento e in membrane, il legame covalente con gruppi aldeidici o amminici risulta essere il metodo che aumenta maggiormente la durata e la stabilità termica del biocatalizzatore e ne consente il riutilizzo[6][7]. Inoltre, la scelta del tipo di supporto diventa di cruciale importanza, esso deve avere diverse caratteristiche che lo rendano compatibile con l'enzima e il mezzo di reazione. Tra i materiali più studiati come supporto per l'immobilizzazione tramite legame covalente, risultano zeolite naturale[7] e l'agarosio[8]. Un'altra opzione molto interessante è l'uso della silice mesoporosa, altamente adatta per l'immobilizzazione enzimatica [9]. Questi materiali hanno aree superficiali molto elevate e c'è la possibilità di sintetizzarli con diverse strutture dei pori (es. schiumosi, cubici, esagonali) e diametri (nell'intervallo 2-50 nm) [10]. Queste caratteristiche possono essere ottimizzate a seconda dell'enzima utilizzato.

Inoltre, queste possono essere funzionalizzate con diversi gruppi per favorire la formazione di legami covalenti tra enzima e supporto.[11]. Quindi scegliendo l'opportuna silice mesoporosa e il tipo di funzionalizzazione per un determinato processo enzimatico, si può ottenere un'efficace immobilizzazione della proteina all'interno dei pori e in alcuni casi anche un miglioramento delle proprietà catalitiche rispetto all'enzima solubile[12].

1.1.1 Svolgimento lavoro

In questo lavoro sono stati caratterizzati 3 tipi di silice e una zeolite naturale con microscopia elettronica a scansione di emissione di campo (FESEM) e fisisorbimento di N₂ a -196 °C, e testati come supporti di immobilizzazione per gli enzimi AldDH e ADH. In particolare, una silice mesoporosa a struttura esagonale (MSU-H), con diametro medio dei pori di 7 nm, due silici mesoporose con struttura mesocellulare a schiuma (MSU-F e MCF0,75) con poro medio rispettivamente di 15 e 25 nm [9], e una zeolite con struttura lamellare con dimensione del poro medio di 15 nm [13]. Dopo una funzionalizzazione dei supporti, con gruppi amminici o aldeidici, gli enzimi sono stati legati covalentemente ai supporti. L'enzima AldDH non è mai stato immobilizzato su silice mesoporosa con questa tecnica e l'utilizzo di questi due enzimi non è mai stato sperimentato per la conversione di acidi carbossilici.

È stato scelto il miglior supporto per ogni enzima utilizzato, valutando l'attività enzimatica e la resa di immobilizzazione. Per il biocatalizzatore più promettente, è stata poi valutata l'attività (enzima immobilizzato sul supporto) al variare del pH e della temperatura per ciascun enzima immobilizzato sui diversi supporti, confrontandola con quella degli enzimi

liberi. È stato osservato che l'enzima immobilizzato risulta essere relativamente più attivo in condizioni anche diverse da quelle ottimali, sia in termini di temperatura che di pH. La stabilità termica è stata valutata incubando l'enzima libero e immobilizzato a 50 °C e valutando l'attività residua in tempi diversi. Dimostrando che questi tipi di supporti sono adatti per questi enzimi e l'immobilizzazione consente di ottenere un elevato fattore di stabilità. Successivamente sono state effettuate le due reazioni di riduzione. La prima reazione è stata condotta utilizzando acido propionico e NADH e la seconda utilizzando propionaldeide e NADH. Per valutare la conversione, è stata misurata la diminuzione dell'assorbanza di NADH nel tempo utilizzando uno spettrofotometro UV-VIS. L'effettiva produzione di propionaldeide utilizzando il primo enzima e di propanolo utilizzando il secondo enzima è stata ricavata tramite GC-MS con spazio di testa. Sono stati svolti anche dei test con la presenza contemporanea di entrambi gli enzimi nel batch di reazione per andare a studiare se e come venissero migliorate le prestazioni dei singoli enzimi. Infine, è stato effettuato un test di riutilizzo, valutando l'attività residua dopo diversi cicli di reazione.

1.2 Catalisi enzimatica

Gli enzimi sono ben noti come catalizzatori altamente efficaci ed efficienti di un'ampia varietà di processi caratterizzati da alta selettività e attività. Inoltre, gli enzimi possono ridurre il numero di fasi di reazione e le quantità di solventi pericolosi necessari e quindi rendere un processo più economico e rispettoso dell'ambiente essendo materiale organico e quindi biodegradabile.

Come tutti gli altri catalizzatori, gli enzimi sono caratterizzati da due proprietà fondamentali. In primo luogo, aumentano la velocità delle reazioni chimiche senza essere consumati o alterati in modo permanente dalla reazione. In secondo luogo, aumentano le velocità di reazione senza alterare l'equilibrio chimico tra reagenti e prodotti.

Per queste ragioni gli enzimi sono diventati catalizzatori estremamente importanti, mostrando un grande potenziale in molte applicazioni industriali che vanno da quelle alimentari a quelle farmaceutiche.

Il legame di un substrato al sito attivo di un enzima è un'interazione molto specifica. I siti attivi sono fessure o solchi sulla superficie di un enzima, solitamente composti da amminoacidi provenienti da diverse parti della catena polipeptidica che sono riuniti nella struttura terziaria della proteina ripiegata. I substrati si legano inizialmente al sito attivo mediante interazioni non covalenti, inclusi legami idrogeno, legami ionici e interazioni idrofobiche. Una volta che un substrato è legato al sito attivo di un enzima, molteplici meccanismi possono accelerare la sua conversione nel prodotto della reazione[14].

Nel progettare un processo biocatalitico bisogna tenere in considerazione alcuni parametri che possono incidere sulla stabilità e sul tempo di disattivazione.

Molti enzimi naturali sono sensibili ai solventi organici. Generalmente operano in un range ridotto di pH e ne tollerano una variazione molto bassa, il pH è spesso un parametro difficile da controllare in un processo. Gli enzimi naturali funzionano in modo efficiente a temperature specifiche con intervalli abbastanza ristretti. Le deviazioni di temperatura possono causare cambiamenti nella cinetica di reazione, nella resa del prodotto o in altri esiti critici del processo.

La quantità di ossigeno disciolto è un parametro particolarmente importante per le reazioni di riduzione. Al fine di garantire che gli enzimi ossidoreduttasi possano operare alla massima efficienza, è fondamentale ottimizzare la quantità e il trasferimento di massa dell'ossigeno disciolto nella miscela di reazione, comprese le caratteristiche delle bolle.

La maggior parte degli enzimi risulta instabile e con alti costi di produzione e separazione dei prodotti, rendendo difficile il recupero degli enzimi ancora attivi.

Uno dei procedimenti più importanti e ampiamente utilizzati è l'immobilizzazione dell'enzima in cui i catalizzatori sono attaccati fisicamente a un supporto solido che è insolubile nella miscela di reazione. Il più grande vantaggio dell'immobilizzazione è un miglioramento significativo della stabilità delle biomolecole in varie condizioni di reazione rendendo possibile il loro riutilizzo nei cicli catalitici successivi e la possibilità anche di poter operare in continuo. Inoltre, dopo aver legato l'enzima, i catalizzatori passano da una forma omogenea a una eterogenea, il che facilita la semplice separazione del sistema biocatalitico dalla miscela di reazione il che si traduce in prodotti di maggiore purezza. Un ulteriore vantaggio è una maggiore facilità di controllo del processo che può essere fermato rimuovendo il supporto.

Sono state sviluppate varie tecniche di immobilizzazione, tra cui l'adsorbimento, il legame covalente, l'intrappolamento, l'incapsulamento e il cross-linking. Queste differiscono nel tipo e nel carattere delle interazioni che si formano tra enzima e supporto, nella forma e nel tipo di materiali di supporto utilizzabili. La selezione del metodo più appropriato di immobilizzazione e del materiale di supporto dipende fortemente dal tipo e dalle condizioni del processo catalitico e dal tipo di enzima. Tuttavia, la selezione dei materiali di supporto è una sfida importante a causa dell'impatto che il materiale può avere sulle proprietà della biomolecola.

Una varietà molto ampia di materiali di varia origine può essere usata come supporto per l'immobilizzazione dell'enzima. Questi materiali possono, in generale, essere divisi in organici, inorganici e ibridi o compositi.

Il supporto dovrebbe proteggere la struttura dell'enzima dalle possibili condizioni di reazione sfavorevoli e quindi aiutare l'enzima immobilizzato a mantenere un'elevata attività catalitica. Tuttavia, ci sono alcune limitazioni in questo settore, perché la matrice non deve avere un effetto negativo sulla struttura dell'enzima e non deve disturbare l'enzima più di quanto sia necessario per creare interazioni stabili tra enzima e matrice. Inoltre, ci dovrebbe essere affinità tra i gruppi funzionali dei due materiali per permettere la formazione di queste interazioni enzima-matrice e l'effettivo legame dell'enzima al supporto.

Il supporto dovrebbe esporre i siti attivi del catalizzatore per favorire l'interazione delle molecole di substrato con l'enzima e per ridurre così le limitazioni di mass transfer[15].

1.2.1 Enzimi Studiati: ADH e AldDH

Le alcool deidrogenasi, (ADH) (EC 1.1.1.1), sono una classe di enzimi contenenti zinco, che catalizzano l'ossidazione degli alcoli primari e secondari alla corrispondente aldeide o chetone mediante il trasferimento di un anione idruro al NAD⁺ con rilascio di un protone. Nell'uomo e in molti altri animali, servono a scomporre gli alcoli, che altrimenti risulterebbero tossici, e partecipano anche alla generazione di utili gruppi aldeidici, chetonici o alcolici durante la biosintesi di vari metaboliti. Nel lievito, nelle piante e in molti batteri, alcune alcool deidrogenasi catalizzano la reazione opposta come parte della fermentazione per assicurare un costante rifornimento di NAD⁺ [16].

Sono proteine dimeriche, con ogni sub unità che lega due ioni Zn²⁺, solo uno dei quali è cataliticamente attivo. Questo ione catalitico Zn²⁺ ha una geometria tetraedrica distorta, risulta essere coordinato a un'istidina e due residui di cisteina. Lo zinco non catalitico svolge un ruolo strutturale ed è coordinato tetraedricamente a quattro residui di cisteina. L'alcool deidrogenasi (ADH) proveniente da *Saccharomyces cerevisiae* è un enzima

costitutivo che riduce l'acetaldeide ad etanolo durante la fermentazione del glucosio. La struttura di ADH è stata determinata mediante cristallografia a raggi X. L'unità asimmetrica contiene quattro diverse sub unità, chiamati AB e CD (figura 1.2) [17]. Ogni sub unità nel dimero ha un tipico dominio di legame del coenzima con piega di Rossmann, cioè un foglio plissettato parallelo a sei filamenti, e ci sono due eliche su ciascun lato del foglio e il coenzima si lega all'estremità terminale carbossilica. L'ampia interazione dei due domini di legame del coenzima produce un foglio β esteso nel dimero. Ogni sub unità ha anche un dominio catalitico, che contiene un atomo di zinco a cui si lega l'alcol e un anello di zinco strutturale remoto in un anello distante [18]. Le sub unità A e C hanno una conformazione "chiusa" e contengono NAD e TFE legati allo zinco catalitico in una coordinazione "classica", mentre le sub unità B e D hanno una conformazione "aperta", che ha una coordinazione alternativa, ed è presente nessun coenzima legante. Una cellula unitaria contiene tre molecole biologiche, ciascuna delle quali è composta da due diversi tetrameri con sub unità AB: AB e CD: CD [16].

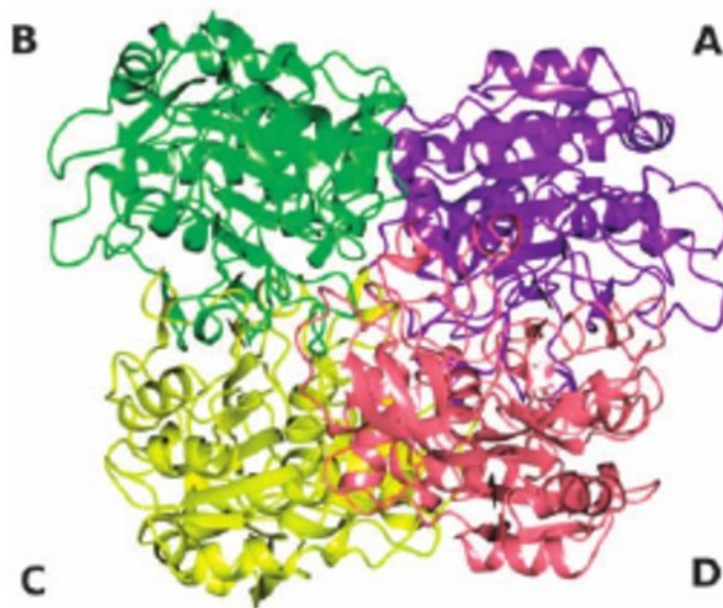


Figura 1.2 Struttura ADH [19]

Meccanismo di reazione:

Dopo essersi legato al NAD^+ la molecola d'acqua viene spostata dall'atomo di zinco dall'arrivo del substrato alcolico. La deprotonazione dell'alcol coordinato produce come intermedio un alcossido di zinco, che poi subisce il trasferimento di idruro a NAD^+ per dare aldeide legate a zinco e NADH [16]. Una molecola d'acqua sposta l'aldeide per rigenerare il centro catalitico originale e infine viene rilasciato NADH per completare il ciclo catalitico (figura 1.2). Pertanto il ruolo dello zinco nella reazione di deidrogenazione è quello di promuovere la deprotonazione dell'alcol, andando così a migliorare il trasferimento di idruro dall'intermedio alcossido. Al contrario, nella reazione di idrogenazione inversa, il suo ruolo è quello di migliorare l'elettrofilia dell'atomo di carbonio carbonilico [18].

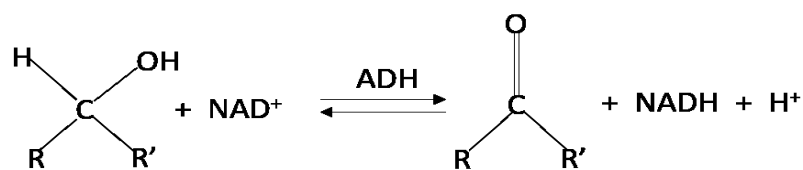


Figura 1.3 Meccanismo ADH

Aldeide Deidrogenasi (AldDH) estratta dal lievito richiede ioni potassio e tioli (glutazione, 2-mercaptoetanolo, cisteina) per la sua attività. È inibito da tracce di metalli pesanti, in particolare rame.

L'aldeide deidrogenasi (EC 1.2.1.3) catalizza la deidrogenazione di un'ampia varietà di aldeidi in presenza di nicotinammide adenina dinucleotide (NAD⁺) come coenzima. Convertono le aldeidi (R-C(=O)-H) in acidi carbossilici (R-C(=O)-O-H). L'ossigeno proviene da una molecola d'acqua. Le aldeidi deidrogenasi appartengono ad una famiglia di enzimi che giocano un ruolo chiave nel metabolismo delle aldeidi di derivazione sia endogena che esogena [20].

La forma attiva dell'enzima è un dimero, costituito da due identiche sub unità residue. Ogni sub unità contiene un legame NAD(P), un sito catalitico e un dominio ponte (simile a un braccio) [21]. Le sub unità nel dimero sono legate da una doppia simmetria. Il dimero è stabilizzato da un totale di 62 legami idrogeno intramolecolari. I residui N-terminali formano un cluster di quattro eliche, α 1- α 4[20].

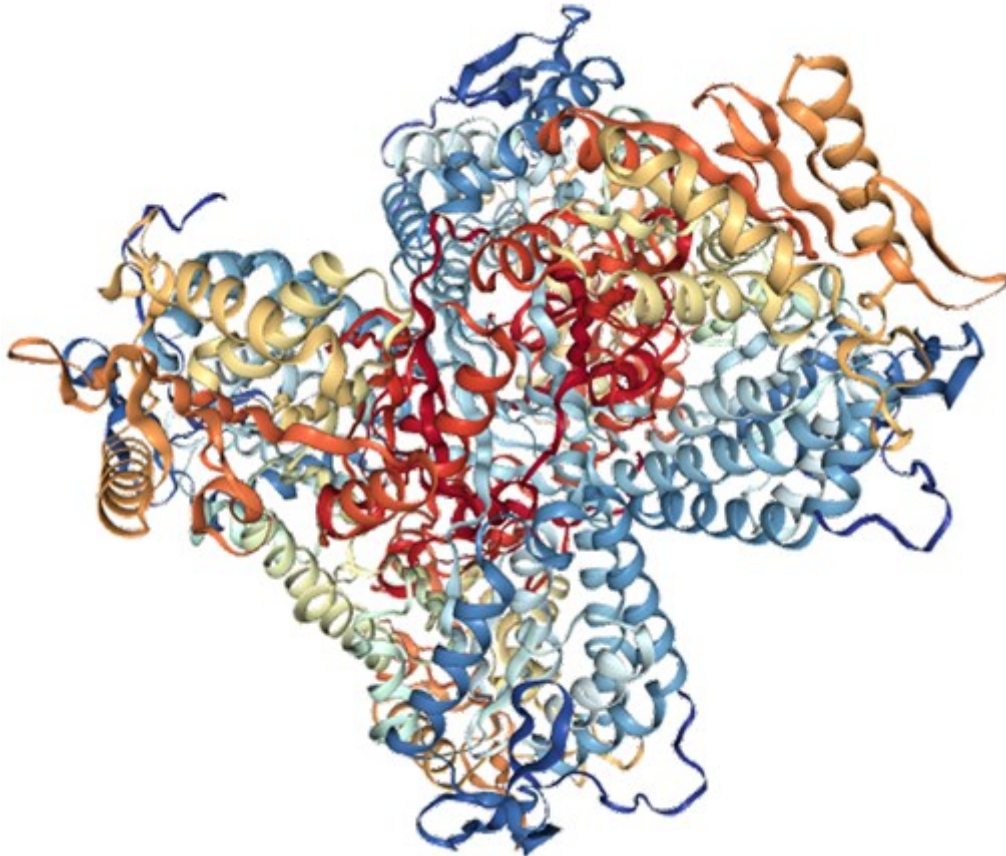


Figura 1.4 Struttura AldDH[22]

Meccanismo di reazione:

La reazione NAD(P)⁺ dipendente, catalizzata da ALDH è: $RCHO + NAD^+ + H_2O \rightarrow RCOOH + NADH + H^+$. In questa reazione, l'aldeide entra nel sito attivo attraverso un canale che si estende dalla superficie dell'enzima. Il sito attivo contiene una piega di Rossman e le interazioni tra il cofattore e la piega consentono l'azione del sito attivo.

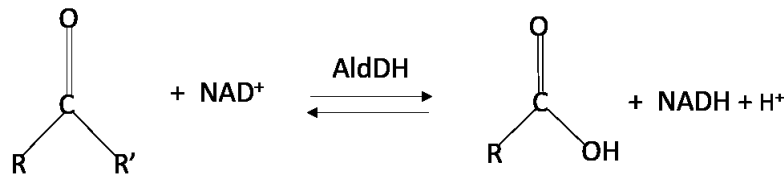


Figura 1.5 Meccanismo AldDH

Un atomo di zolfo dell'amminoacido cisteina presente nel sito attivo fa un attacco nucleofilo al carbonio carbonilico dell'aldeide. L'idrogeno viene espulso come un idruro e attacca NAD(P)⁺ per produrre NAD(P)H. Il sito attivo dell'enzima passa quindi attraverso un cambiamento isomorfo per cui il NAD(P)H viene spostato, creando spazio per una molecola d'acqua per accedere al substrato. L'acqua è innescata da un glutammato nel sito attivo, la quale effettua un attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico, dando il via allo zolfo come gruppo uscente[21].

L'Adenina nicotinammide dinucleotide (NAD) è un coenzima essenziale per il metabolismo, è stato ritrovato in tutte le cellule viventi. Consiste in due nucleotidi uniti attraverso i loro gruppi fosfato. Il NAD esiste in due forme: una ossidata NAD⁺ e una ridotta NADH (figura 1.6).

Nel metabolismo il NAD è coinvolto nelle reazioni redox, trasportando elettroni da una reazione all'altra. Il cofattore si trova quindi in due forme: NAD⁺ è un agente ossidante, accetta elettroni da altre molecole e si riduce. Questa reazione origina NADH, che può quindi essere utilizzato come agente riducente per donare elettroni. Queste reazioni di trasferimento di elettroni sono la funzione principale del NAD.

Il ruolo principale del NAD⁺ è quello di trasferire elettroni da una molecola all'altra. Reazioni di questo tipo sono catalizzate da un ampio gruppo di enzimi chiamati ossidoreduttasi. Quando è legato al sito attivo dell'enzima, l'anello nicotinammide del coenzima è posizionato in modo che possa accettare un idruro dall'altro substrato.

Le reazioni redox catalizzate dalle ossidoreduttasi sono vitali in tutti gli step del metabolismo, ma una funzione fondamentale è quella di consentire ai nutrienti di sbloccare l'energia immagazzinata nel doppio legame relativamente debole dell'ossigeno. I composti ridotti come il glucosio e gli acidi grassi vengono ossidati, rilasciando così energia chimica.

A causa della carica positiva sull'atomo di azoto nell'anello della nicotinammide, la forma ossidata di questo importante reagente redox è spesso descritta come NAD⁺. Nelle cellule, la maggior parte delle ossidazioni si ottiene rimuovendo gli atomi di idrogeno. Il coenzima NAD svolge un ruolo cruciale in questo. Ogni molecola di NAD⁺ può acquisire due elettroni; cioè essere ridotto di due elettroni. Tuttavia, solo un protone accompagna la riduzione. L'altro protone prodotto quando due atomi di idrogeno vengono rimossi dalla molecola che viene ossidata viene liberato nel mezzo circostante

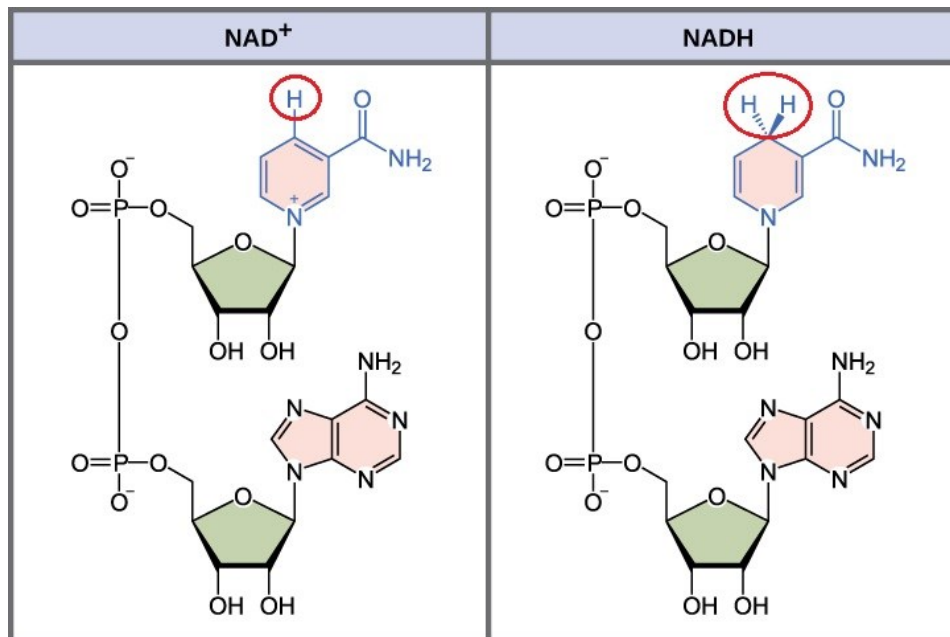


Figura 1.6 Struttura NAD e NADH[23]

1.3 Tecniche di immobilizzazione enzimatica

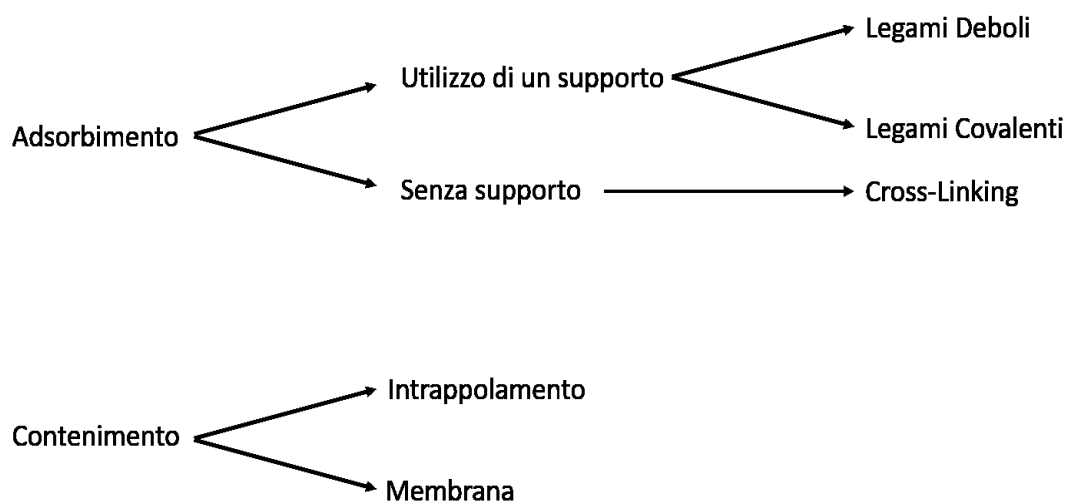


Figura 1.7 Tecniche di immobilizzazione enzimatica

1.3.1 Adsorbimento

Il meccanismo di adsorbimento si basa su legami deboli come forze di Van der Waals, forze elettrostatiche e interazioni idrofobiche. L'enzima è dissolto in soluzione e il supporto solido è messo in contatto con l'enzima in soluzione per un determinato tempo. L'enzima non adsorbito viene rimosso tramite lavaggio con acqua e buffer.

L'immobilizzazione per adsorbimento risulta essere un processo semplice senza l'uso di reagenti, economico e in genere non riduce l'attività dell'enzima perché non richiede nessuna funzionalizzazione del supporto[25].

Questa tecnica presenta però alcuni svantaggi: l'enzima sono debolmente legati al supporto per questo temperatura, pH e forza ionica possono portare al desorbimento e al

dilavamento. L'immobilizzazione per adsorbimento si può dividere in tre categorie: adsorbimento fisico il quale prevede che il supporto sia posto in una soluzione con l'enzima e lasciato per un determinato periodo di tempo affinché si formino deboli forze. Poiché questo metodo si basa su deboli interazioni risulta essere reversibile e può avvenire perdita di enzimi cambiando le condizioni[6].

L'adsorbimento tramite forze elettrostatiche si verifica quando la superficie dell'enzima può avere carica positiva o negativa in base alla differenza tra punto isoelettrico dell'enzima e pH della soluzione, così che la molecola possa essere immobilizzata sulla superficie a carica opposta tramite interazioni ioniche e polari forti.

Un altro approccio prevede l'uso di interazioni idrofobiche tra il supporto e le molecole enzimatiche. I legami si formano dal dislocamento delle molecole d'acqua dalla superficie del materiale e dalle molecole enzimatiche durante l'immobilizzazione.

La forza d'interazione dipende dall'idrofobicità sia dell'enzima che del supporto, queste possono essere modificate variando pH, temperatura, e concentrazione dei sali disciolti[24].

1.3.2 Legame covalente

L'immobilizzazione enzimatica tramite legame covalente è uno dei metodi maggiormente utilizzati, dove si creano legami stabili tra i gruppi funzionali del supporto e i gruppi funzionali dei residui amino acidi dell'enzima.

I gruppi funzionali che possono essere usati sono: amminici, carbossilici, fenolici, solfidrici, tioli, idrossilici.

L'attività dell'enzima dipende dalla forma e dimensione del materiale di supporto, dalla composizione e dalle condizioni durante la formazione del legame.

Per la creazione del legame covalente tra supporto ed enzima risulta essere cruciale l'orientazione dell'enzima, che determina perciò la stabilità. Si raggiunge una maggiore attività quando il sito attivo non è coinvolto nel legame con il supporto.[25]

L'accoppiamento con il supporto può essere fatto in due modi, in base ai gruppi attivi presenti sulla molecola da immobilizzare. Il gruppo funzionale può essere aggiunto al supporto, o la matrice può essere modificata per generare gruppi attivi. In entrambi i casi i gruppi elettrofili del supporto reagiscono con quelli nucleofili delle proteine.

Il legame covalente permette una forte interazione così da avere poca perdita di enzima, ma con questa tecnica c'è la possibilità di denaturare l'enzima. Questo metodo permette di riutilizzare l'enzima prevenendo il rilascio nell'ambiente di reazione, inoltre aumenta il tempo di dimezzamento e la stabilità termica. L'aumento della stabilità deriva da legami covalenti illimitati tra enzima e supporto per la mancanza di barriere tra i due.[24]

1.3.3 Intrappolamento

Nell'immobilizzazione per intrappolamento l'enzima non è direttamente attaccato alla superficie del supporto, ma è intrappolato nella rete polimerica che permette solo il passaggio del substrato e dei prodotti e diminuisce la diffusione dell'enzima.

L'intrappolamento avviene tramite due passaggi: miscelamento dell'enzima in una soluzione monomerica seguito dalla polimerizzazione della soluzione tramite reazione chimica.[25]

L'enzima intrappolato nel reticolo polimerico non interagisce chimicamente con il polimero, questo metodo può aumentare la stabilità dell'enzima e minimizzare le perdite e

la denaturazione. Un altro vantaggio è la possibilità di ottimizzare il microambiente che si viene a creare nella matrice polimerica modificando il materiale per avere un pH ottimale e polarità.

Tuttavia, un limite di questo metodo è la diminuzione del mass transfer causato dallo spessore della matrice, per questo motivo il substrato non riesce a diffondere a fondo nel polimero. Inoltre, gli enzimi intrappolati possono essere soggetti a dilavamento se le dimensioni dei pori della matrice sono troppo grandi.

Questo metodo ha una bassa capacità di carico dell'enzima e il supporto può essere danneggiato durante il processo di polimerizzazione[24].

1.3.4 Cross-linking

L'enzima viene reso insolubile per la formazione di legami intermolecolari tra le proteine tramite un reagente bifunzionale, come la glutaraldeide. Questa tecnica può essere fatta su enzimi solubili (cross-linked enzymes, CLE), enzimi cristallizzati (CLEC) o su enzimi aggregati (CLEA). Queste metodologie differiscono solamente per il precursore proteico, hanno il vantaggio che non vengono coinvolti supporti inerti essendo che l'enzima è auto-immobilizzato nella sua stessa massa proteica, inoltre l'attività specifica del biocatalizzatore è molto alta, essendo la concentrazione vicina al limite.

Il metodo CLE non viene più utilizzato in quanto l'aggregato che si veniva a formare aveva scarse proprietà meccaniche e importanti perdite di attività, inoltre le condizioni di processo sono difficili da controllare[24].

CLEC sono prodotti per cross-link di cristalli di enzimi purificati e possiedono ottime proprietà: alta stabilità in condizioni sfavorevoli come alta temperatura o pH estremi, resistenza all'autolisi e alta attività specifica. Inoltre possiedono ottime caratteristiche meccaniche e il loro recupero risulta facile. Lo svantaggio principale è legato all'alto costo per la necessità di avere gli enzimi purificati.

I CLEA sono prodotti tramite una procedura in due step: tramite l'aggiunta di sali, solventi organici o polimeri si promuove l'aggregazione degli enzimi solubili, dopo di che si stabilizzano gli aggregati per cross-linking (di solito con glutaraldeide). Tramite questa procedura vengono prodotti aggregati insolubili e stabili [25][6].

1.4 Acidi Carbossilici

acidi carbossilici sono una classe di composti organici in cui un atomo di carbonio (C) è legato a un atomo di ossigeno (O) da un doppio legame e a un gruppo ossidrile (-OH) da un singolo legame. Un quarto legame lega l'atomo di carbonio a un atomo di idrogeno (H) o a un altro atomo o a un altro gruppo. Il gruppo carbossilico (COOH) è così chiamato a causa del gruppo carbonilico (C=O) e del gruppo ossidrile.

La principale caratteristica chimica degli acidi carbossilici è la loro acidità. Sono generalmente più acidi di altri composti organici contenenti gruppi idrossilici, ma sono generalmente più deboli degli acidi minerali (ad esempio acido cloridrico, HCl, acido solforico, H₂SO₄, ecc.).

Gli acidi carbossilici si trovano ampiamente in natura. Gli acidi grassi sono componenti dei gliceridi, che a loro volta sono componenti dei grassi. Gli acidi idrossilici, come l'acido lattico (presente nei prodotti a base di latte acido) e l'acido citrico (presente negli

agrumi), e molti chetoacidi sono importanti prodotti metabolici presenti nella maggior parte delle cellule viventi [31].

I derivati degli acidi carbossilici hanno svariate applicazioni. Ad esempio, oltre all'uso come disinfettante, l'acido formico, il più semplice acido carbossilico, viene impiegato nel trattamento dei tessuti e come agente riducente acido. L'acido acetico è ampiamente utilizzato nella produzione di materie plastiche ed esteri di cellulosa. L'aspirina, l'estere dell'acido salicilico, viene preparata dall'acido acetico. L'acido palmitico e l'acido stearico sono importanti nella produzione di saponi, cosmetici, prodotti farmaceutici, candele e rivestimenti protettivi. L'acido stearico viene utilizzato anche nella produzione della gomma. L'acido acrilico è impiegato come estere nella produzione di polimeri (molecole a catena lunga) noti come acrilati. L'acido oleico è utilizzato nella produzione di saponi e detersivi e di tessuti [33].

La proprietà più importante degli acidi carbossilici è la loro acidità. Un acido è un qualsiasi composto che dona uno ione idrogeno, H^+ (chiamato anche protone), a un altro composto, chiamato base. Gli acidi carbossilici lo fanno molto più facilmente della maggior parte delle altre classi di composti organici, quindi si dice che siano acidi più forti, anche se sono molto più deboli dei più importanti acidi minerali. La ragione dell'aumentata acidità di questo gruppo di composti può essere meglio dimostrata confrontando la loro acidità con quella degli alcoli, entrambi i quali contengono un gruppo $-OH$, ma gli alcoli sono composti neutri in soluzione acquosa. Quando un alcol dona il suo protone, diventa uno ione negativo chiamato ione alcossido, RO^- . Quando un acido carbossilico dona il suo protone, diventa uno ione con carica negativa, $RCOO^-$, chiamato ione carbossilato [32].

Sintesi di acidi carbossilici: la maggior parte dei metodi per la sintesi degli acidi carbossilici può essere classificata in una delle due categorie: (1) idrolisi di derivati acidi e (2) ossidazione di vari composti.

Idrolisi di derivati acidi: tutti i derivati acidi possono essere idrolizzati per dare acidi carbossilici, i più facili da idrolizzare sono i cloruri acilici, che richiedono solo l'aggiunta di acqua. I sali degli acidi carbossilici vengono convertiti istantaneamente nei corrispondenti acidi a temperatura ambiente semplicemente per trattamento con acqua e un acido forte come l'acido cloridrico. Esteri carbossilici, nitrili e ammidi sono meno reattivi e tipicamente devono essere riscaldati con acqua e un acido o una base forte per dare il corrispondente acido carbossilico. Se si usa una base, si forma un sale invece dell'acido carbossilico, ma il sale viene facilmente convertito in acido mediante trattamento con acido cloridrico. Di questi tre tipi di derivati acidi, le ammidi sono le meno reattive e richiedono il trattamento più dispendioso in termini di energia (cioè temperature più elevate e riscaldamento più prolungato) [33].

L'ossidazione degli alcoli primari è un metodo comune per la sintesi degli acidi carbossilici: $RCH_2OH \rightarrow RCOOH$. Ciò richiede un forte agente ossidante, il più comune è l'acido cromico (H_2CrO_4), il permanganato di potassio ($KMnO_4$) e l'acido nitrico (HNO_3). Altrettanto importante è l'ossidazione delle catene laterali alchiliche degli anelli aromatici da parte di forti agenti ossidanti come acido cromico, permanganato di potassio e acido nitrico per produrre acidi carbossilici aromatici. Indipendentemente dal numero di atomi di carbonio nella catena laterale o dalla presenza di gruppi ad essi collegati, se il primo carbonio nella catena alchilica è legato ad almeno un idrogeno (e non a un altro anello aromatico), tutti tranne uno i C vengono rimossi e solo un gruppo $COOH$ rimane legato all'anello aromatico [31] [32].

1.5 Altri metodi di conversione degli acidi carbossilici

1.5.1 Chetonizzazione

La chetonizzazione è una reazione in cui due acidi carbossilici si convertono in un chetone, anidride carbonica e acqua. Mentre questa reazione ha trovato una volta la sua applicazione industriale per la produzione di acetone, sta riacquistando interesse per il suo valore nell'upgrading degli ossigenati derivati dalla biomassa, ad esempio, i bio-oli ottenuti dalla pirolisi veloce della biomassa. Vale a dire, la chetonizzazione è fondamentale per ridurre gli effetti dannosi degli acidi carbossilici nel bio-olio.[2] Data l'assenza di solventi, additivi o altri composti dannosi, la chetonizzazione si mostra come un processo pulito di upgrading degli scarti delle biomasse. La chetonizzazione degli acidi carbossilici con la parziale deidrogenazione forma chetoni a catena corta che possono essere impiegati come precursori per combustibili e sostanze chimiche.[26] Questo processo si distingue in chetonizzazione di massa, che avviene tramite la decomposizione dei corrispondenti sali carbossilati, e chetonizzazione superficiale, che è catalizzata da superfici solide.[2]

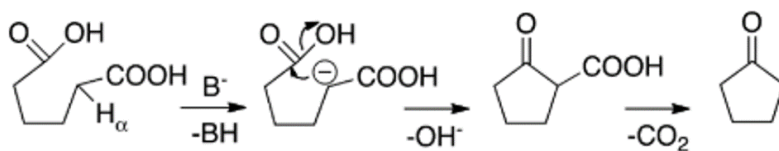


Figura 1.8 Chetonizzazione[2]

1.5.2 Funghi

I funghi filamentosi rappresentano un vasto gruppo di organismi con una grande biodiversità, avendo pattern enzimatici eterogenei, complessi e aspecifici questo li rende dei validi reagenti per la biocatalisi. Sono in grado di crescere velocemente usando semplici fonti di carbonio e rispetto a molti batteri riescono a lavorare a temperatura e pressione ambiente.

Nella conversione di acidi carbossilici è stato *S. racemosum*, un fungo non patogeno presente nell'aria. Viene usato per la biotrasformazione l'intera cellula garantendo importanti caratteristiche e miglierie rispetto ai processi classici. L'uso dei funghi diminuisce l'impatto ambientale, riduce i costi e aumenta la sicurezza incrementando la sostenibilità del processo. L'atmosfera non necessita di controllo in quanto l'ossigeno non deve essere rimosso e l'idrogeno non deve essere aggiunto inoltre, la reazione avviene in un mezzo acquoso con un basso contenuto di solventi organici e senza la formazione di sottoprodotti tossici. Il consumo energetico è azzerato poiché questo fungo non richiede un sistema di riscaldamento.

Poiché non si utilizza materiale pericoloso durante il processo si riducono i rischi di esposizione, esplosione ed incendi. Per il recupero del prodotto si opera una semplice procedura di estrazione, non si usa quenching o filtrazione dei sali di metallo[3].

1.5.3 Batteri

Negli ultimi anni sono stati studiati ceppi di termoanaerobatteri in grado di convertire acidi grassi a catena corta in alcoli usando cellule in costante crescita, di particolare interesse è il ceppo AK152 (*thermohydrosulfuricus*). Il ceppo AK152 è un anaerobio termofilo con la capacità di crescere utilizzando un'ampia gamma di temperature e pH (50/70/75 C e pH 4.0/7.0/8.0) con la capacità di utilizzare molti carboidrati, presenta un pH ottimale di 7 con una temperatura vicina ai 70°C, riuscendo a degradare una varietà di composti presenti nella biomassa lignocellulosica come monosaccaridi disaccaridi e amido. Il ceppo è altamente etanogeno, producendo fino all'86% della resa teorica di etanolo. Il ceppo AK152 risulta però inibito già ad una concentrazione iniziale di substrato relativamente bassa (30 mM), che porta a una degradazione inefficiente del glucosio e al livellamento di tutta la formazione del prodotto finale. Sebbene il ceppo abbia limitazioni come la sua sensibilità a concentrazioni elevate di glucosio, possiede la capacità di ridurre gli acidi carbossilici da C2 a C6 ai loro corrispondenti alcoli primari utilizzando il glucosio come fonte di potenziale riducente[4].

1.6 Supporti

Per questo progetto di tesi si è scelto di utilizzare per l'immobilizzazione enzimatica principalmente dei supporti silicei mesoporosi con elevate aree superficiali (400-700 m²/g). Dalla loro scoperta nel 1990 da ricercatori giapponesi e dalla loro prima sintesi nel 1992 da parte della Mobil Corporation, questi materiali hanno continuato ad attirare l'attenzione per le loro proprietà superiori come la possibilità di modificare la struttura dei pori, l'elevata area superficiale, enorme volume dei pori, stabilità termica e chimica e la facilità di funzionalizzazione. Queste proprietà li rendono utilizzabili in processi di adsorbimento, catalisi, separazione chimica e applicazioni biotecnologiche ad esempio come base di nanodispositivi per il rilascio controllato di farmaci e geni nelle cellule viventi[27].

Sulla base della grandezza dei pori la IUPAC ha classificato i materiali porosi in tre categorie:

1. Materiali microporosi sono i materiali con diametri dei pori inferiori a 2 nm, ad esempio le zeoliti e strutture metallo-organiche
2. I materiali con diametro dei pori compreso tra 2 e 50 nm sono materiali mesoporosi
3. I materiali con diametro dei pori superiore a 50 nanometri sono detti macroporosi.

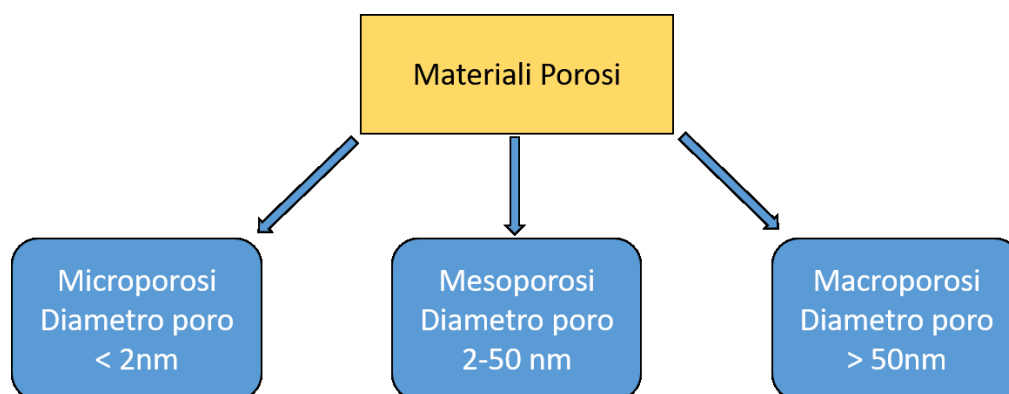


Figura 1.9 Classificazione materiali in base alla dimensione dei pori

I primi materiali sintetizzati sono stati chiamati MCM-X (Mobil Crystalline of Materials) presentavano pori cilindrici ordinati secondo una geometria esagonale con dimensione tra i 2 e i 4 nm[28]. Lo sviluppo di SBA-15 (Santa Barbara amorphous-15) e MCF (Mesocellular Foam), tramite l'utilizzo di polimeri formati da tre blocchi (PEO-PPO-PEO: glicole polietilenico-glicole polipropilenico-glicole polietilenico), ha permesso di estendere in range della dimensione dei pori ben oltre i 4 nm [29]. SBA-15, ha pori cilindrici di dimensioni di circa 5 nm con una geometria esagonale, sintetizzati con il Pluronic P123 come polimero precursore[28]. MCF invece viene sintetizzato aggiungendo un cosolvente organico (mesitilene) alla procedura dell'SBA-15, questo permette una trasformazione strutturale del supporto che diventa "spugnoso" formato da celle sferiche interconnesse fra di loro tramite dei pori aventi dimensione di circa 20 nm[29]. Inoltre, i supporti MCF possono essere sintetizzati con differenti dimensioni dei pori variando il rapporto mesitilene/P123.

Le silici mesoporose risultano essere dei supporti molto interessanti per l'immobilizzazione enzimatica. Questi supporti possiedono anche delle ottime proprietà meccaniche che permettono al catalizzatore di sopportare delle condizioni operative dove sono presenti sforzi di taglio e compressione maggiori rispetto ad altri supporti di origine biologica.

È emerso come la funzionalizzazione con GPTMS, che aggiunge gruppi aldeici sulla superficie del supporto, risulti essere molto efficiente per l'immobilizzazione enzimatica poiché i gruppi aldeici sono molto reattivi con i terminali amminici dell'enzima libero. Vengono a formarsi legami forti tra l'enzima e il supporto e questo causa un irrigidimento dell'enzima, quindi un'alta stabilità termica[30].

Poiché questi materiali hanno delle dimensioni e conformazioni che possono essere modificate, andando a scegliere la silice mesoporosa più opportuna per un determinato processo enzimatico, si può ottenere un'efficace immobilizzazione della proteina all'interno dei pori e in alcuni casi anche un miglioramento delle proprietà catalitiche[10][12].

In questa tesi si è studiato come differenti supporti con caratteristiche diverse in termini di area superficiale e dimensioni dei pori, vadano a modificare le prestazioni degli enzimi ADH e AldDH immobilizzati sempre con le stesse metodologie.

Bibliografia

- [1] M. Kalim Akhtara, N. J. Turner, and P. R. Jones, "Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 1, pp. 87–92, 2013, doi: 10.1073/pnas.1216516110.
- [2] T. N. Pham, T. Sooknoi, S. P. Crossley, and D. E. Resasco, "Ketonization of carboxylic acids: Mechanisms, catalysts, and implications for biomass conversion," *ACS Catal.*, vol. 3, no. 11, pp. 2456–2473, 2013, doi: 10.1021/cs400501h.
- [3] E. Brenna *et al.*, "Biocatalysed reduction of carboxylic acids to primary alcohols in aqueous medium: A novel synthetic capability of the zygomycete fungus *Syncephalastrum racemosum*," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 116, pp. 83–88, 2015, doi: 10.1016/j.molcatb.2015.03.010.
- [4] S. M. Scully and J. Orlygsson, "Biotransformation of carboxylic acids to alcohols: Characterization of thermoanaerobacter strain ak152 and 1-propanol production via propionate reduction," *Microorganisms*, vol. 8, no. 6, pp. 1–18, 2020, doi: 10.3390/microorganisms8060945.
- [5] A. H. Bhatt, Z. (Jason) Ren, and L. Tao, "Value Proposition of Untapped Wet Wastes: Carboxylic Acid Production through Anaerobic Digestion," *iScience*, vol. 23, no. 6, p. 101221, 2020, doi: 10.1016/j.isci.2020.101221.
- [6] I. Andrés, *Enzyme Biocatalysis, principles and application*. .
- [7] G. Pietricola, C. Ottone, D. Fino, and T. Tommasi, "Enzymatic reduction of CO₂ to formic acid using FDH immobilized on natural zeolite," *J. CO₂ Util.*, vol. 42, p. 101343, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jcou.2020.101343.
- [8] J. M. Bolivar, J. Rocha-martín, C. Mateo, and J. M. Guisan, "Stabilization of a highly active but unstable alcohol dehydrogenase from yeast using immobilization and post-immobilization techniques," *Process Biochem.*, vol. 47, no. 5, pp. 679–686, 2012, doi: 10.1016/j.procbio.2012.01.012.
- [9] G. Pietricola *et al.*, "Synthesis and characterization of ordered mesoporous silicas for the immobilization of formate dehydrogenase (FDH)," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 177, pp. 261–270, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.114.
- [10] M. Zezzi do Valle Gomes and A. E. C. Palmqvist, "Immobilization of formaldehyde dehydrogenase in tailored siliceous mesostructured cellular foams and evaluation of its activity for conversion of formate to formaldehyde," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 163, pp. 41–46, 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.11.069.
- [11] K. Kannan and R. V. Jasra, "Immobilization of alkaline serine endopeptidase from *Bacillus licheniformis* on SBA-15 and MCF by surface covalent binding," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 56, no. 1, pp. 34–40, 2009, doi: 10.1016/j.molcatb.2008.04.007.
- [12] N. Balistreri, D. Gaboriau, C. Jolival, and F. Launay, "Covalent immobilization of glucose oxidase on mesocellular silica foams: Characterization and stability towards temperature and organic solvents," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 127, pp. 26–33, 2016, doi: 10.1016/j.molcatb.2016.02.003.
- [13] M. Dosa *et al.*, "Properties of the Clinoptilolite: Characterization and Adsorption Tests with Methylene Blue," *J. Adv. Catal. Sci. Technol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–10, 2018, doi: 10.15379/2408-9834.2018.05.01.01.
- [14] G. M. Cooper, "The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts," 2000, Accessed: Oct. 25, 2021. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9921/>.
- [15] J. Zdarta, A. S. Meyer, T. Jesionowski, and M. Pinelo, "A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility,"

Catalysts, vol. 8, no. 2, 2018, doi: 10.3390/catal8020092.

[16] S. B. Raj, S. Ramaswamy, and B. V. Plapp, "Yeast Alcohol Dehydrogenase Structure and Catalysis," *Biochemistry*, vol. 53, no. 36, pp. 5791–5803, 2014, doi: 10.1021/bi5006442.

[17] O. De Smidt, J. C. Du Preez, and J. Albertyn, "The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: A comprehensive review," *FEMS Yeast Res.*, vol. 8, no. 7, pp. 967–978, 2008, doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00387.x.

[18] W. G. Gutheil, B. Holmquist, and B. L. Vallee, "Purification, Characterization, and Partial Sequence of the Glutathione-Dependent Formaldehyde Dehydrogenase from *Escherichia coli*: A Class III Alcohol Dehydrogenase," *Biochemistry*, vol. 31, no. 2, pp. 475–481, 1992, doi: 10.1021/bi00117a025.

[19] M. Karabec *et al.*, "Structural insights into substrate specificity and solvent tolerance in alcohol dehydrogenase ADH-'A' from *Rhodococcus ruber* DSM 44541," *Chem. Commun.*, vol. 46, no. 34, pp. 6314–6316, 2010, doi: 10.1039/c0cc00929f.

[20] Z. J. Liu *et al.*, "The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 4, no. 4, pp. 317–326, 1997, doi: 10.1038/nsb0497-317.

[21] V. Koppaka *et al.*, "Aldehyde dehydrogenase inhibitors: A comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application," *Pharmacol. Rev.*, vol. 64, no. 3, pp. 520–539, 2012, doi: 10.1124/pr.111.005538.

[22] "ALDH1A1 (Aldehyde Dehydrogenase 1 family member A1)." <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ALDH1A1ID53077ch9q21.html>.

[23] "NAD+ and NADH | BioSerendipity." https://www.bioserendipity.com/anti-aging-supplements-ii/nad_nadh/.

[24] H. H. Nguyen and M. Kim, "An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization," *Appl. Sci. Conver. Technol.*, vol. 26, no. 6, pp. 157–163, 2017, doi: 10.5757/asct.2017.26.6.157.

[25] N. R. Mohamad, N. H. C. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, and R. A. Wahab, "An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes," *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 29, no. 2, pp. 205–220, 2015, doi: 10.1080/13102818.2015.1008192.

[26] B. Boekaerts and B. F. Sels, "Catalytic advancements in carboxylic acid ketonization and its perspectives on biomass valorisation," *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 283, no. July 2020, p. 119607, 2021, doi: 10.1016/j.apcatb.2020.119607.

[27] S. Kumar, M. M. Malik, and R. Purohit, "Synthesis Methods of Mesoporous Silica Materials," *Mater. Today Proc.*, vol. 4, no. 2, pp. 350–357, 2017, doi: 10.1016/j.matpr.2017.01.032.

[28] E. M. Johansson, *Controlling the Pore Size and Morphology of Mesoporous Silica [Elektronisk resurs]*, no. 1451. 2010.

[29] J. S. Lettow *et al.*, "Hexagonal to mesocellular foam phase transition in polymer-templated mesoporous silicas," *Langmuir*, vol. 16, no. 22, pp. 8291–8295, 2000, doi: 10.1021/la000660h.

[30] C. Bernal, L. Sierra, and M. Mesa, "Improvement of thermal stability of β -galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macro-mesoporous silica," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 84, pp. 166–172, 2012, doi: 10.1016/j.molcatb.2012.05.023.

[31] "carboxylic acid - Properties of carboxylic acids | Britannica." <https://www.britannica.com/science/carboxylic-acid/Properties-of-carboxylic-acids>. [32]

[32] S. T. Yang, H. Huang, A. Tay, W. Qin, L. De Guzman, and E. C. San Nicolas, "Extractive Fermentation for the Production of Carboxylic Acids," *Bioprocess. Value-*

Added Prod. from Renew. Resour., pp. 421–446, 2007, doi: 10.1016/B978-044452114-9/50017-7.

[33] K. Hu and A. J. Bard, “Use of atomic force microscopy for the study of surface acid-base properties of carboxylic acid-terminated self-assembled monolayers,” *Langmuir*, vol. 13, no. 19, pp. 5114–5119, 1997, doi: 10.1021/la9700782.

[34] C. Mao, Y. Feng, X. Wang, and G. Ren, “Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 45, pp. 540–555, 2015, doi: 10.1016/j.rser.2015.02.032.

2. Materiali e metodi

Per le prove svolte in questa attività di tesi sono stati utilizzati tre supporti silicei: MSU-H, MSU-F, MCF 0.75 e una zeolite naturale (Clinoptilolite). Tra i supporti silicei è stato sintetizzato MCF 0.75 mentre gli altri sono disponibili commercialmente.

2.1 Sintesi MCF 0.75

Vengono preparati 500 mL di soluzione acquosa di HCL 2M, in seguito si diluiscono 160 mL della soluzione acida con 60 mL di acqua deionizzata in un becher. Vengono poi aggiunti 8 g di Pluronic 123 ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_{70}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}\text{H}$) mantenendo in agitazione alla temperatura di 35°C per un'ora così che la soluzione risulti omogenea. Successivamente vengono aggiunti 6 mL di Mesitylene (1,3,5 – trimetilbenzene, C_9H_{12} , 98% in peso) goccia a goccia lasciando ancora in agitazione per un'ora alla stessa temperatura. Essendo il rapporto massico Mesitylene/Pluronic di 0,75, la funzione del mesitilene è quella di permettere alle micelle cilindriche di assumere una forma circolare aumentando la dimensione dei pori del supporto. Infine si aggiunge, sempre goccia a goccia, 17 g di TEOS (tetraossisilano al 99% in peso, $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$) e si lascia in agitazione per 24 ore alla temperatura di 35°C. La soluzione viene posta in forno per il trattamento termico alla temperatura di 100°C per un tempo di 24 ore, questo processo consente un aumento della dimensione dei pori delle sfere di silice. Terminato il trattamento la soluzione viene raffreddata, lavata e filtrata sottovuoto.

A questo punto il materiale viene lasciato essiccare a 60°C per 12 ore, come ultimo passaggio si ha la calcinazione che avviene a 500°C per 6 ore, con una rampa termica di 5°C al minuto. Questo passaggio ha lo scopo di liberare i pori dai residui di tensioattivi presenti e dall'acqua rimasta.

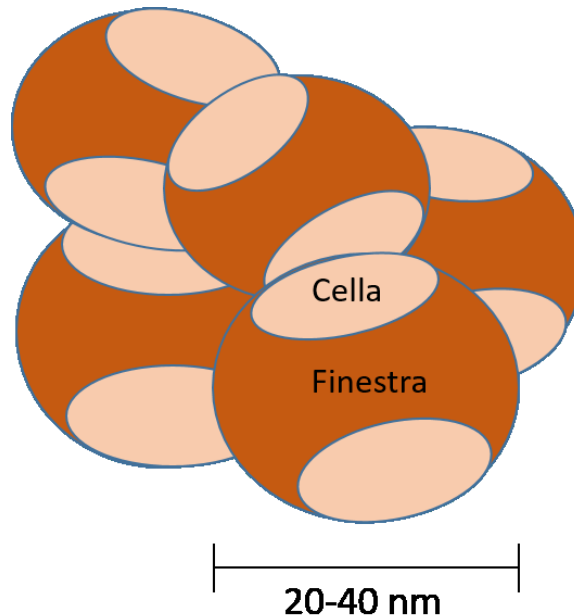


Figura 2.1 Struttura MCF 0.75

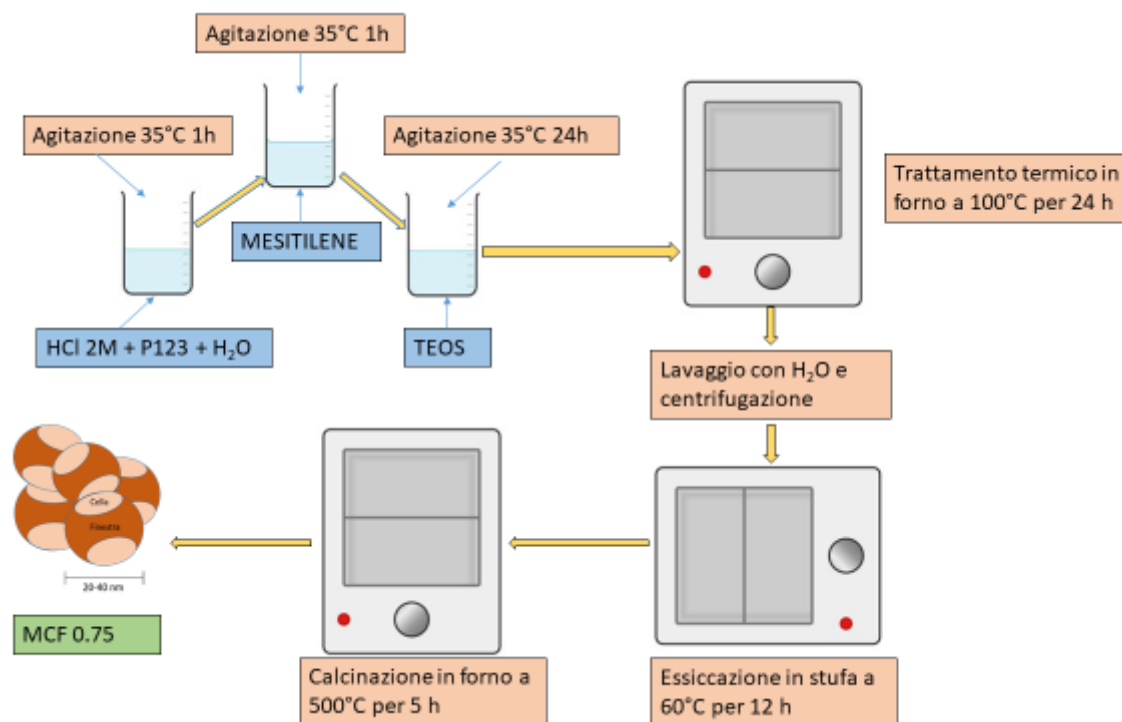


Figura 2.2 Schema sintesi MCF 0.75

2.2 Caratterizzazione supporti

2.2.1 Analisi mediante fisisorbimento di N₂ a -196 °C

Queste prove sono state eseguite sia su campioni di supporto originale, sia su supporti funzionalizzati che su supporti dove vi è stato immobilizzato l'enzima.

Sono stati scelti MSU-F e MCF 0.75 in quanto hanno una dimensione dei pori maggiore dell'ingombro sterico dell'enzima e per questo motivo immobilizzandosi all'interno dei pori è auspicabile una diminuzione dell'area specifica e della distribuzione della dimensione dei pori.

Tramite questa tecnica, utilizzata per la caratterizzazione dei materiali porosi, è possibile ricavare l'area specifica, il volume dei pori e la distribuzione dei pori. Le analisi sono eseguite su campioni che vengono introdotti in delle burette. Subiscono un pretrattamento a 150°C per 2 ore così da evitare che il legame covalente dell'immobilizzazione venga scisso da una temperatura troppo elevata, in questo modo si rimuove acqua e agenti contaminanti atmosferici.

La misura viene effettuata a bassa temperatura e pressioni e consiste nella valutazione del volume di gas adsorbito dal solido a varie pressioni. Consiste in cicli successivi di adsorbimento/desorbimento di N₂ a 77 K, ricavando così i punti dell'isoterma di adsorbimento dalla quale si ricava tramite il metodo BET (*Brunauer-Emmet-Teller*) l'area specifica[1].

Il metodo BJH (*Barrett-Joyner-Halenda*) è invece utilizzato per il calcolo della distribuzione dei pori, basato sui fenomeni di condensazione capillare in pori cilindrici. Dividendo il volume dei pori per il volume totale si ricava la porosità del materiale. Al valore di pressione relativa P/P_0 di 0.99 si ottiene il volume totale dei pori (V_p) pari al volume di liquido adsorbito[2].



Figura 2.3 *Micromeritics TriStar II 3020.*

2.2.2 FE-SEM

Per indagare in modo più accurato la morfologia dei supporti si è utilizzato un microscopio elettronico a scansione ad alta risoluzione (FE-SEM). Lo strumento utilizzato è il SUPRA™ 40 (ZEISS) equipaggiato di una colonna GEMINI (Figura 2). Il sistema genera un fascio di elettroni ad alta energia nel vuoto attraverso una colonna ad emissione di campo e in seguito questi sono accelerati in un campo magnetico ad alto gradiente. Questi elettroni emessi vengono poi deflessi da un sistema di lenti per produrre un fascio molto concentrato che poi andrà ad investire il campione da analizzare. A seguito dell'urto di questi elettroni si generano degli elettroni secondari, dall'angolo e dalla velocità di quest'ultimi si ricavano informazioni sulla morfologia del campione.

Sui campioni è stato applicato uno strato di platino di spessore inferiore ai 5 nm per renderli conduttivi e permettere agli elettroni emessi di diffondersi sui campioni[3].



Figura 2.4 Microscopio elettronico a scansione SUPRA™ 40 (ZEISS).

2.2.3 Funzionalizzazione supporto con gruppi amminici

La reazione avviene sotto cappa chimica all'interno di un pallone con una colonna di raffreddamento ad acqua. 1 g di supporto viene fatto reagire con 30 mL di amminopropiltrirossilano (APTES) 1% in volume in toluene. Il tutto è mantenuto alla temperatura di 105°C tramite bagno d'olio per un tempo complessivo di 5 h. Il bagno è mantenuto alla temperatura desiderata tramite piastra riscaldante. Tramite la colonna raffreddata ad acqua si evita l'evaporazione del toluene. Si opera infine un primo lavaggio con acetone per rimuovere il toluene dal supporto e un secondo con acqua deionizzata per asportare l'acetone (figura 2.4) [4]. Il protocollo utilizzato è stato modificato dalla letteratura [5].

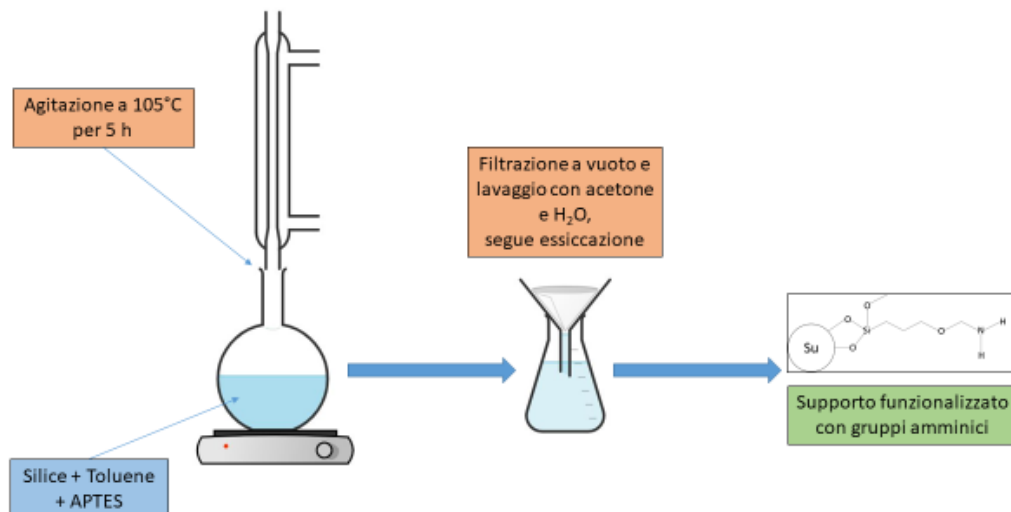


Figura 2.5 Schema funzionalizzazione gruppi amminici

2.2.4 Funzionalizzazione supporto con gruppi aldeidici

La funzionalizzazione con gruppi aldeidici avviene attraverso 3 reazioni in serie (figura 2.6), sotto cappa chimica. In un pallone 1 g di supporto reagisce con 30 mL di glicidossipropiltrimetossisilano (GPTMS) 1% in volume in toluene. La reazione avviene alla temperatura di 105°C per un tempo di 5h sotto agitazione. Il bagno d'olio è mantenuto alla temperatura tramite piastra riscaldante. Anche in questo caso sopra il pallone è posta una colonna raffreddata ad acqua per evitare l'evaporazione del toluene. Dopo filtrazione e lavaggio con acetone e acqua distillata, viene effettuata l'idrolisi dei gruppi aldeidici tramite una reazione con 30mL di soluzione 0.1 M di H₂SO₄ per 2h alla temperatura di 85°C sotto agitazione in un pallone con colonna di raffreddamento. In questo caso dopo la filtrazione viene effettuato un lavaggio solo con acqua deionizzata, infine viene eseguita un'ossidazione usando 30mL di soluzione 0.1 M di NaIO₄ a temperatura ambiente per 2h ottenendo così i gruppi aldeidici sulla superficie del supporto. La procedura è stata modificata a partire dal metodo usato da Bernal[6].

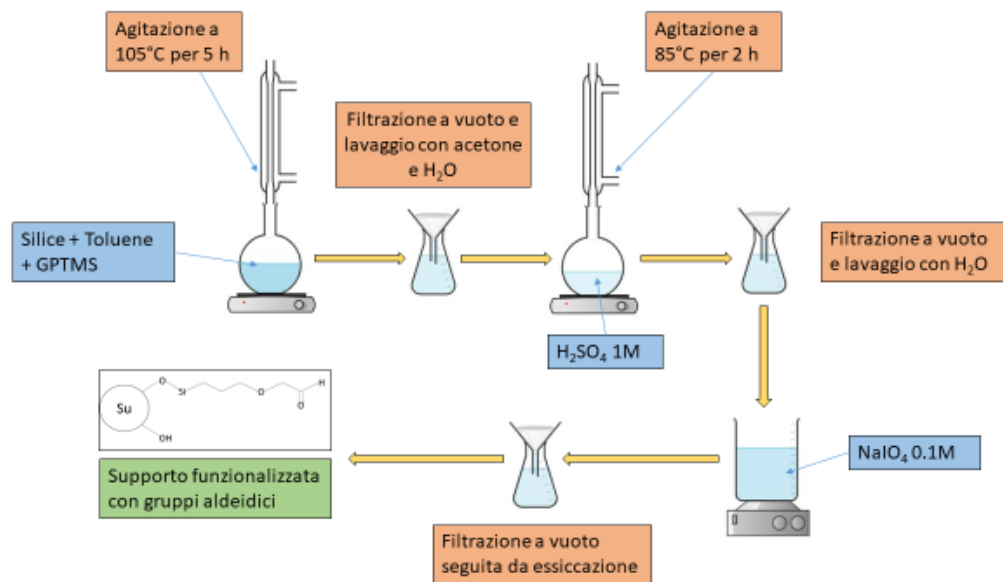


Figura 2.6 Schema funzionalizzazione gruppi aldeidici

Le moli di gruppi generati vengono quantificate tramite retro-titolazione con NaHCO₃/KI, come descritto da Guisan[7]. L'assorbanza del surnatante, misurata a 420 nm, prima e dopo il processo di ossidazione viene correlata alla quantità di gruppi aldeidici prodotti[4]. È possibile ricavare la quantità di gruppi aldeidici presenti in superficie tramite l'equazione:

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

$X = \mu\text{mol aldeidi} / \text{g supporto}$

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

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

A_f = assorbanza soluzione dopo la reazione
 A_i = assorbanza soluzione prima della reazione
 g_s = quantità di supporto utilizzata (g)

2.3 Immobilizzazione

2.3.1 Immobilizzazione Aldeide Deidrogenasi (AldDH)

La reazione di immobilizzazione tra enzima e supporto avviene in un buffer fosfato 100mM a pH 10, mantenuto alla temperatura di 4°C tramite un bagno di acqua refrigerata[7]. Il pH è fondamentale perché al di sotto non avviene la reazione. Si mantiene la temperatura bassa così da evitare la disattivazione dell'enzima anche se la reazione risulta più lenta.

Si procede usando 30 ml di soluzione, utilizzando un carico enzimatico di 4 mg di enzima per grammo di supporto e si lascia reagire per 3h.

Prima di aggiungere il supporto si preleva 1 ml di soluzione, così da poter fare un confronto sul cambiamento dell'attività tra il bianco (enzima non in contatto con il supporto) e del surnatante durante la reazione di immobilizzazione. Tra enzima e supporto si creano dei legami deboli di Schiff e l'attività del surnatante decresce nel tempo.

Passato il tempo di reazione si aggiungono glicerolo, 15 % in volume, con la funzione di proteggere l'enzima e NaBH₄ con una concentrazione di 0,5 mg/ml per stabilizzare il legame in quanto riduce il legame di Schiff a un legame covalente.

Si fa reagire il tutto per altri 10 minuti alla temperatura di 4°C, segue filtrazione a vuoto e lavaggio del supporto con acqua distillata e buffer fosfato 100 mM a pH 7 (figura 2.7).

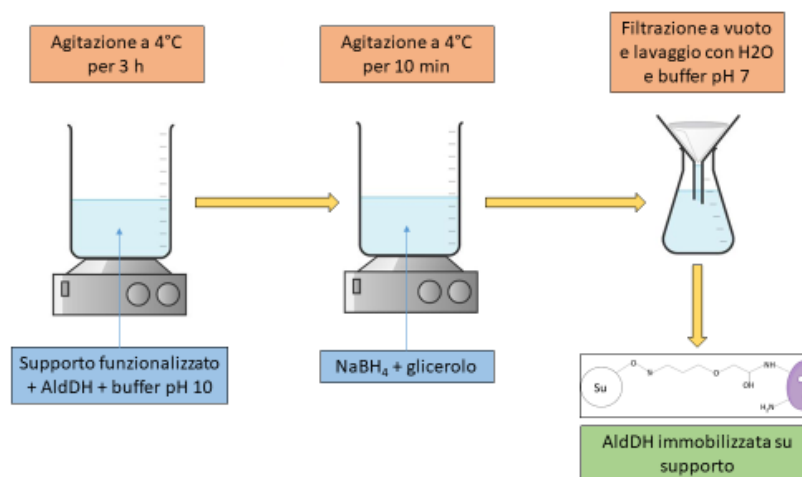


Figura 2.7 Schema immobilizzazione AldDH

2.3.2 Immobilizzazione Alcol Deidrogenasi (ADH)

La reazione di immobilizzazione è analoga a quanto descritto precedentemente, ma in questo caso si usa un buffer fosfato 5 mM a pH 7. Anche in questo caso si mantiene la temperatura costante a 4°C per un tempo di reazione di 3 h. A seguito del quale si procede a filtrare la soluzione senza lavaggio.

A questo punto si pone il supporto in una soluzione di buffer fosfato 25 mM, 30 ml per grammo di supporto, e glutaraldeide 0,1% in volume per 30 minuti in frigorifero.

Segue filtrazione a vuoto e lavaggio con acqua distillata e buffer fosfato 25mM a pH 7 (figura 2.8).

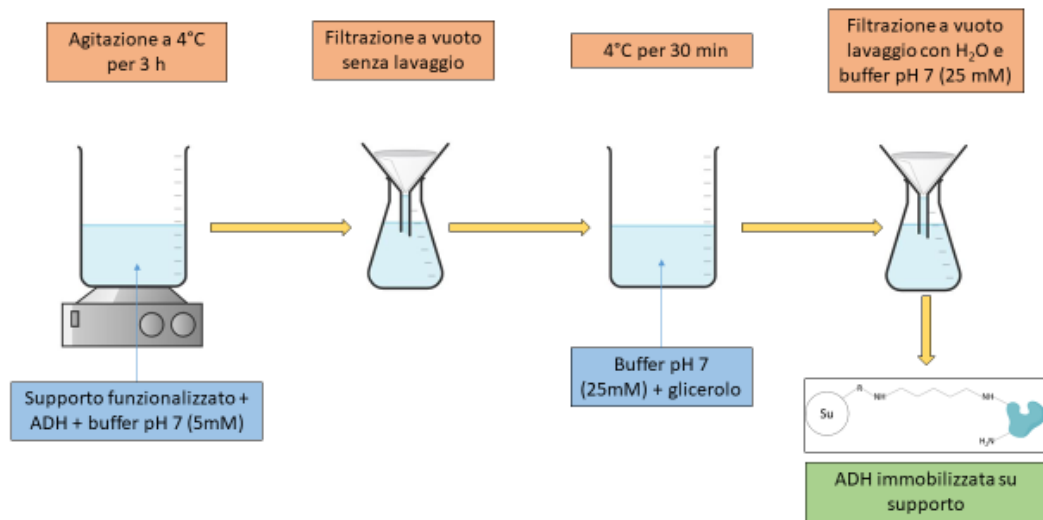


Figura 2.8 Schema immobilizzazione ADH

2.3.3 Resa di immobilizzazione

Per la valutazione della quantità di proteine immobilizzate si usa il Saggio di Bradford, grazie al quale si ricava la concentrazione delle proteine in soluzione (mg/ml) misurando l'assorbanza a 596 nm di una miscela di colorante (Coomassie Brilliant Blue) e proteina. La concentrazione viene ricavata tramite una retta di taratura costruita su una proteina di riferimento (sieroalbumina)

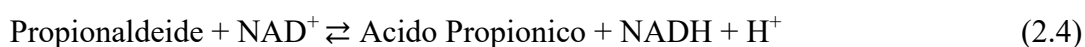
Per l'assorbanza si usa una soluzione formata da 2 ml di reagente di Bradford e da 200 µl di soluzione proteica prelevata durante il processo di immobilizzazione, dopo una centrifugazione per eliminare il supporto presente in soluzione. Vengono confrontate due soluzioni proteiche, la prima prelevata prima di aggiungere il supporto (C_0) e l'altra a fine reazione (C_F), per calcolare la resa di immobilizzazione (IY_p) definita come:

$$IY_p = \frac{C_0 - C_F}{C_0} \times 100 \quad (2.2)$$

2.4 Misura dell'attività enzimatica

L'attività enzimatica è definita in UI (Unità Internazionale di attività enzimatica) e rappresenta la quantità di enzima necessaria a catalizzare la trasformazione di 1 μ Mole di substrato al minuto in condizioni definite di temperatura, pH e concentrazione di substrato[8][9].

Per entrambi gli enzimi viene misurato l'incremento di assorbanza a 340 nm del NADH prodotto rispetto a un bianco che ha assorbanza 0. Per l'enzima ADH (Alcol Deidrogenasi) dalla reazione con alcol etilico (eq 2.3) mentre per l'enzima AldDH (Aldeide Deidrogenasi) dalla reazione con propionaldeide (eq 2.4).



Per la misura dell'enzima alcol deidrogenasi (ADH) libero si utilizza una soluzione formata da: 2 ml di soluzione X molare di alcol etilico e buffer fosfato 0,1 M a pH 7, 50 μ l di NAD^+ 50 mM e 50 μ l di soluzione enzimatica.

Il medesimo procedimento viene usato per l'enzima aldeide deidrogenasi (AldDH) dove si usa una soluzione formata da: 1,8 ml di buffer fosfato 0,1 M a pH 7, 127 μ l di propionaldeide 7,5 mM, 127 μ l di NAD^+ 50 mM e 187 μ l di soluzione enzimatica diluita. Per misurare l'attività dell'enzima immobilizzato si procede in modo analogo, sostituendo alla soluzione enzimatica 5 mg di supporto[10][11][12].

Con uno spettrofotometro si ottiene la variazione di assorbanza nel tempo ($\Delta A/\Delta t$). L'attività è espressa come:

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

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

V_r = volume soluzione analizzata allo spettrofotometro (ml)

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

ε = coefficiente di assorbimento molare (M^{-1})

L'attività può essere rapportata ai mg di enzima in soluzione oppure ai g di supporto. In questo caso si ottiene l'attività specifica.

2.5 Stabilità termica

Gli enzimi sono strutture altamente definite, soprattutto le parti ripiegate interne. Possono avvenire delle variazioni che non distruggono la capacità catalitica, ma anche piccole modifiche possono influenzare l'attività specifica[13].

Per la valutazione della stabilità termica l'enzima libero ed immobilizzato vengono posti in un bagno a temperatura costante a 50°C in una eppendorf per un tempo di 120 h.

La disattivazione si misura in termini di attività residua dell'enzima rispetto a quella misurata al tempo zero. Per descrivere la disattivazione enzimatica è stato usato un modello cinetico del primo ordine con o senza attività residua. Il modello senza attività residua (eq 2.6) è stato usato per descrivere l'ADH libero mentre il modello con attività residua (eq 2.7) è stato utilizzato per descrivere tutti i supporti con enzima e l'AldDH libero

$$\frac{e}{e_0} = \exp(-k_D \cdot t) \quad (2.6)$$

$$\frac{e}{e_0} = (1 - \alpha) \exp(-k_D \cdot t) + \alpha \quad (2.7)$$

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

e_0 = attività enzimatica iniziale ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

k_D = costante cinetica della disattivazione (h^{-1})

α = rapporto delle attività specifiche tra le specie intermedie e quelle iniziali

k_D e α sono trovati in modo che il modello cinetico approssimi al meglio i dati sperimentali ricavati.

È stato anche calcolato il tempo di dimezzamento, cioè il tempo necessario all'enzima affinché perda metà della sua attività iniziale, come:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_D} \quad (2.8)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln(1-\alpha) - \ln\left(\frac{1}{2} - \alpha\right)}{k_D} \quad (2.9)$$

Per descrivere qualitativamente il legame che si viene a formare tra supporto ed enzima viene definito un fattore di stabilità (SF) come il rapporto del tempo di dimezzamento dell'enzima immobilizzato e quello in soluzione.

$$SF = \frac{t_{1/2}^i}{t_{1/2}^s} \quad (2.10)$$

2.6 pH e Temperatura ottimale

Per la caratterizzazione di pH e Temperatura ottimale del biocatalizzatore sono state eseguite delle prove di attività analoghe a quelle descritte nel paragrafo 2.4. Variando la concentrazione dei sali disciolti nel buffer è possibile modificare il pH dell'ambiente di reazione. Il controllo della temperatura di reazione invece è operato direttamente dallo spettrofotometro.

Dal confronto dei valori di attività si riesce a ricavare il profilo, individuando in questo modo il pH e la temperatura ottimale.

2.7 Reazioni

Le reazioni d'interesse per la conversione degli acidi carbossilici ad alcol sono inverse rispetto a quelle usate per i test di attività.

Per lo studio del primo step della reazione (da acido ad aldeide) si è posto in una boccetta 10 ml di buffer fosfato 100 mM a pH 8,5, Acido propionico 50 mM, NADH 20 mM e 0,1 g di supporto con AldDH immobilizzato. La reazione è stata mantenuta alla temperatura di 30°C per 2 h. Sono stati prelevati e filtrati dei campioni a diversi tempi. Durante la prova è stata misurata la decrescita del NADH in soluzione, successivamente sono poi stati analizzati al GC (Gascromatografo) per la stima dei prodotti ottenuti.

Per il secondo step (da aldeide ad alcol) si è proceduto in modo analogo ponendo in una boccetta 10 ml di buffer fosfato 100 mM a pH 7, Propionaldeide 50 mM, NADH 20 mM e 0,1 g supporto con ADH immobilizzato.

Sono state eseguite anche delle prove aggiuntive a concentrazione maggiore di NADH (50 mM) per vedere se vi era un aumento di conversione.

Infine è stata eseguita una prova di reazione complessiva, cioè con entrambi gli enzimi presenti in soluzione. Per questa prova è stato usato un volume di 20 ml di buffer fosfato 100 mM a pH 8,5, Acido propionico 50 mM, NADH 50 mM, 0,1 g di supporto con AldDH e 0,1 g supporto con ADH.

2.7.1 Analisi HSGC (Gascromatografia dello spazio di testa)

Tramite questa strumentazione si riesce ad analizzare tracce di composti volatili (Propanolo e Propionaldeide) presenti, in proporzione, in una grande massa di solvente. Questa tecnica consiste nell'iniettare il vapore che si trova in equilibrio termodinamico nella vials in colonna. Questo permette di analizzare una frazione arricchita delle specie chimiche riuscendo ad ottenere analisi molto precise e riproducibili. Al termine dell'analisi si ottiene un cromatogramma con picchi differenti a tempi di residenza differenti che indicano le varie specie chimiche. Dall'area di questi picchi è possibile ricavare le concentrazioni.



Figura 2.9 Gascromatogramma con spazio di testa

2.7.2 Prove di riutilizzo

Le prove di riutilizzo vengono eseguite in condizioni analoghe alle reazioni descritte nel paragrafo precedente. Si lascia procedere la reazione per un tempo di un'ora alla fine della quale si filtra e lava il supporto e si svolge un test di attività.

Si ripete la procedura per un totale di 5 reazioni, andando a confrontare la perdita di attività dell'enzima rispetto all'attività del tempo zero.

Bibliografia

- [1] M. Hussain, D. Fino, and N. Russo, "N₂O decomposition by mesoporous silica supported Rh catalysts," *J. Hazard. Mater.*, vol. 211–212, pp. 255–265, 2012, doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.024.
- [2] P. Llewellyn, *Adsorption by Ordered Mesoporous Materials*, 2nd ed. Elsevier Ltd., 2013.
- [3] "Politecnich of Turin - Carbon Group." https://areeweb.polito.it/ricerca/carbongroup/fac_fesem.html.
- [4] G. Pietricola, C. Ottone, D. Fino, and T. Tommasi, "Enzymatic reduction of CO₂ to formic acid using FDH immobilized on natural zeolite," *J. CO₂ Util.*, vol. 42, p. 101343, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jcou.2020.101343.
- [5] P. Vejayakumar, I. A. Rahman, C. S. Sipaut, J. Ismail, and C. K. Chee, "Structural and thermal characterizations of silica nanoparticles grafted with pendant maleimide and epoxide groups," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 328, no. 1, pp. 81–91, 2008, doi: 10.1016/j.jcis.2008.08.054.
- [6] C. Bernal, L. Sierra, and M. Mesa, "Improvement of thermal stability of β -galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macro-mesoporous silica," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 84, pp. 166–172, 2012, doi: 10.1016/j.molcatb.2012.05.023.
- [7] J. M. Guisán, "Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 10, no. 6, pp. 375–382, 1988, doi: 10.1016/0141-0229(88)90018-X.
- [8] G. Pietricola *et al.*, "Synthesis and characterization of ordered mesoporous silicas for the immobilization of formate dehydrogenase (FDH)," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 177, pp. 261–270, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.114.
- [9] I. Andrés, *Enzyme Biocatalysis, principles and application*. .
- [10] S. Aquino, J. C. Forti, V. Zucolotto, P. Ciancaglini, and A. R. De Andrade, "The kinetic behavior of dehydrogenase enzymes in solution and immobilized onto nanostructured carbon platforms," *Process Biochem.*, vol. 46, no. 12, pp. 2347–2352, 2011, doi: 10.1016/j.procbio.2011.09.019.
- [11] J. M. Bolivar, J. Rocha-martín, C. Mateo, and J. M. Guisan, "Stabilization of a highly active but unstable alcohol dehydrogenase from yeast using immobilization and post-immobilization techniques," *Process Biochem.*, vol. 47, no. 5, pp. 679–686, 2012, doi: 10.1016/j.procbio.2012.01.012.
- [12] J. M. Bolivar, L. Wilson, S. A. Ferrarotti, R. Fern, and C. Mateo, "Improvement of the stability of alcohol dehydrogenase by covalent immobilization on glyoxyl-agarose," vol. 125, pp. 85–94, 2006, doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.01.028.
- [13] J. P. Henley and A. Sadana, "Deactivation theory," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 28, no. 8, pp. 1277–1285, 1986, doi: 10.1002/bit.260280821.

3. Risultati

3.1 Caratterizzazione supporti

3.1.1 Analisi mediante fisisorbimento di N₂ a -196 °C (analisi BET)

Come descritto nel paragrafo 2.2.1 sono stati eseguiti test di adsorbimento e desorbimento dell' N₂ e distribuzione dei pori tramite metodo BJH, di seguito vengono riportati i grafici. I campioni analizzati sono MCF 0.75 sintetizzato in laboratorio e MSU-F commerciale, sono stati scelti questi due in quanto presentano pori con una grandezza maggiore dell'ingombro dell'enzima.

Dai cicli di isteresi (figura 3.1) si può notare una diminuzione di quantità di N₂ adsorbita tra il materiale puro e quello con enzimi immobilizzati, dimostrando così una parziale occlusione dei pori dovuta all'immobilizzazione. Dall'ulteriore analisi riportata in figura 3.2 si può vedere come la funzionalizzazione con gruppi aldeidici modifichi la struttura del supporto, andando ad occludere una parte dei pori. Però la curva si abbassa ulteriormente dopo l'immobilizzazione confermando così la buona riuscita dell'operazione. Queste prove aggiuntive riguardanti l'immobilizzazione di AldDH sono state eseguite in quanto durante il processo di funzionalizzazione si fa una reazione con acido solforico, che potrebbe modificare le caratteristiche del supporto. Ipotesi che è stata confermata.

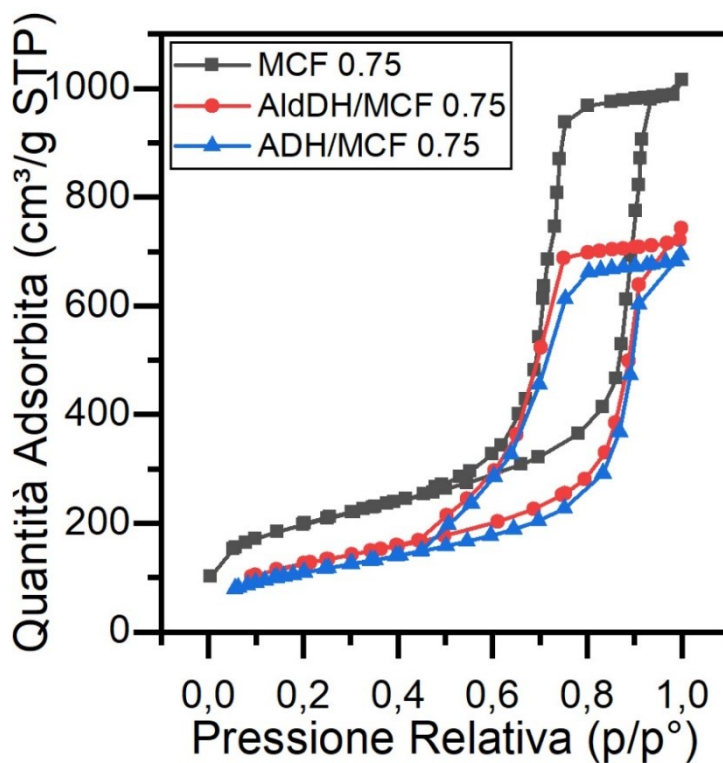


Figura 3.1 Isteresi MCF 0.75 vs MCF 0.75/AldDH vs MCF 0.75/ADH

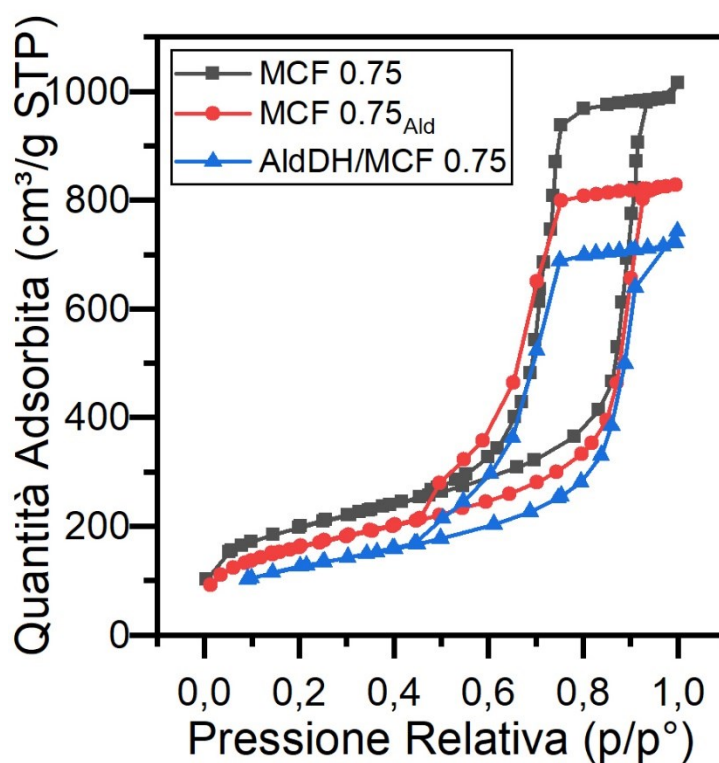


Figura 3.2 Isteresi MCF 0.75 vs MCF 0.75_{Ald} vs AldDH/MCF 0.75

Per quanto riguarda la distribuzione dei pori secondo il metodo BJH si nota come si abbia già un notevole appiattimento dopo la reazione funzionalizzazione (figura 3.3), dimostrando come i pori siano già stati occlusi in questo processo. Si nota un lieve abbassamento della curva dopo l'immobilizzazione di AldDH, indicando che l'immobilizzazione ha avuto successo. Anche per l'enzima ADH si ottiene una curva appiattita (figura 3.4), la distribuzione passa da avere picchi intorno agli 8 nm, cioè tutti di grandezza simile, ad una distribuzione piatta che sta ad indicare come l'immobilizzazione abbia avuto successo e i pori siano occupati.

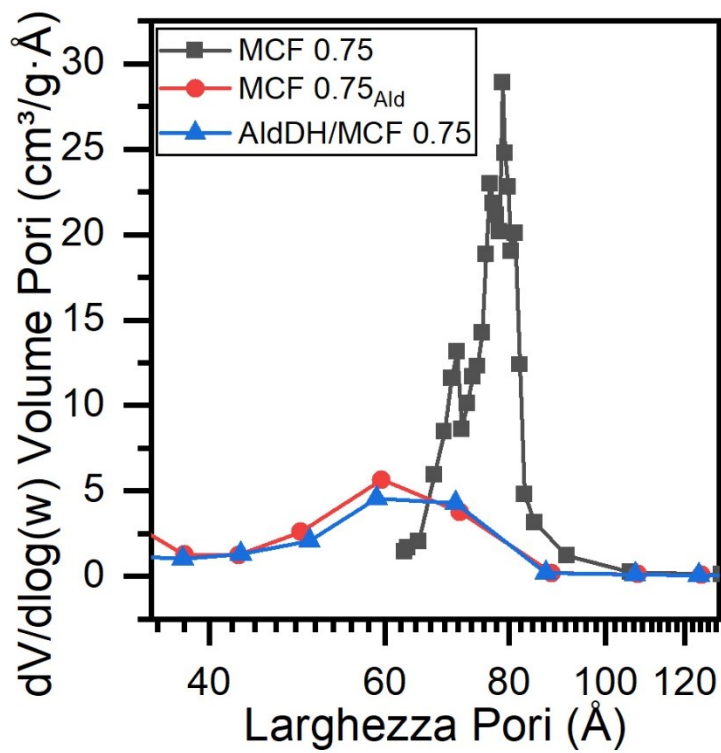


Figura 3.3 Isteresi MCF 0.75 vs MCF 0.75_{ald} vs AldDH/MCF 0.75

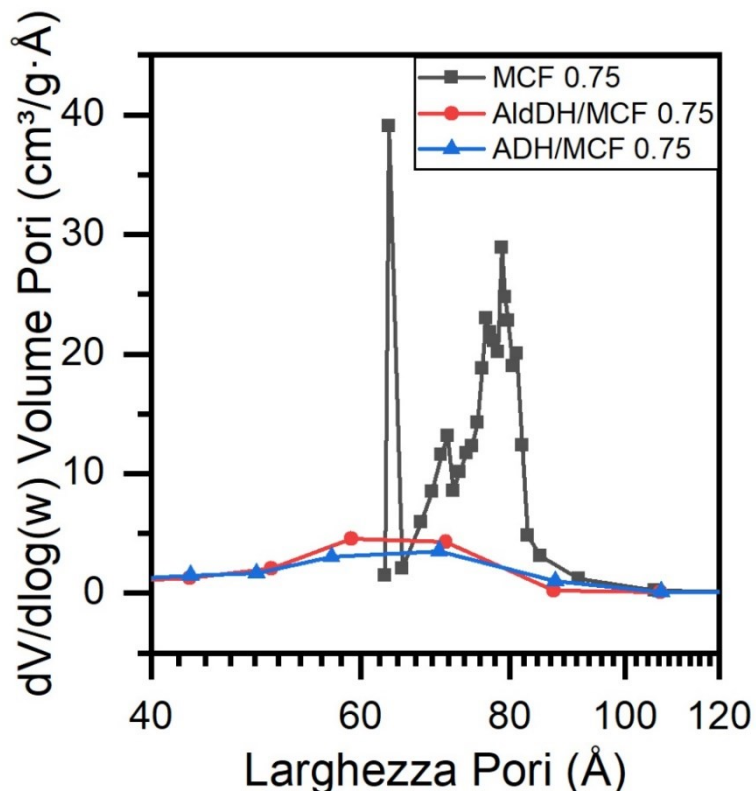


Figura 3.4 Distribuzione dimensione dei pori MCF 0.75 vs MCF 0.75/AldDH vs MCF 0.75/ADH

Per quanto riguarda il supporto MSU-F sono state svolte le stesse prove di caratterizzazione del supporto ottenendo andamenti simili a MCF 0.75.

Dalle curve d'isteresi non si apprezza alcuna differenza tra il supporto tal quale e il supporto funzionalizzato, differenza che diventa invece più visibile nella curva d'isteresi dopo l'immobilizzazione di AldDH (figura 3.6), confermando l'avvenuta immobilizzazione.

Dalla distribuzione dei pori si vede un notevole appiattimento dopo la funzionalizzazione (figura 3.7), ma con ancora la presenza di un picco intorno ai 16 nm. Indicando così che si ha già una modifica importante dei pori prima dell'immobilizzazione dell'enzima.

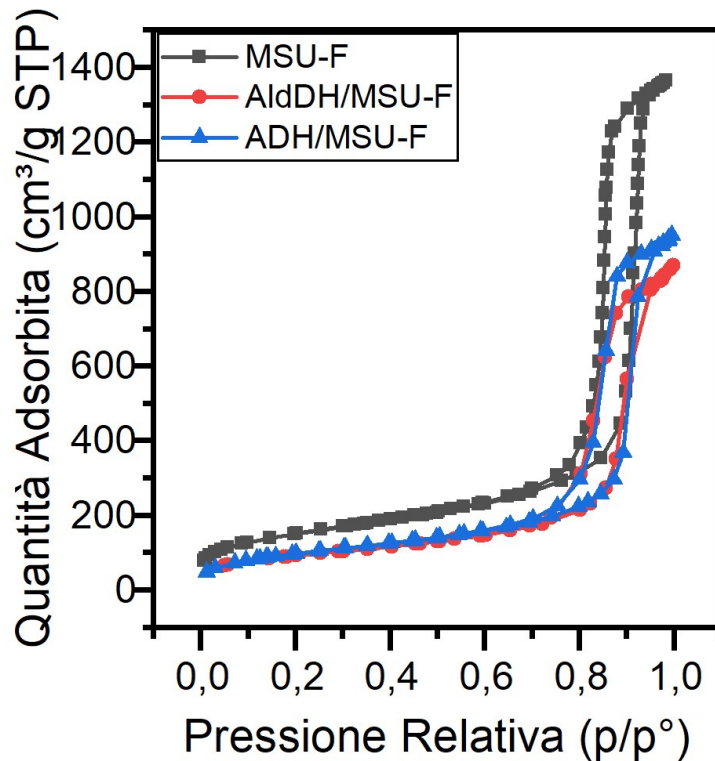


Figura 3.5 Isteresi MSU-F vs MSU-F/AldDH vs MSU-F/ADH

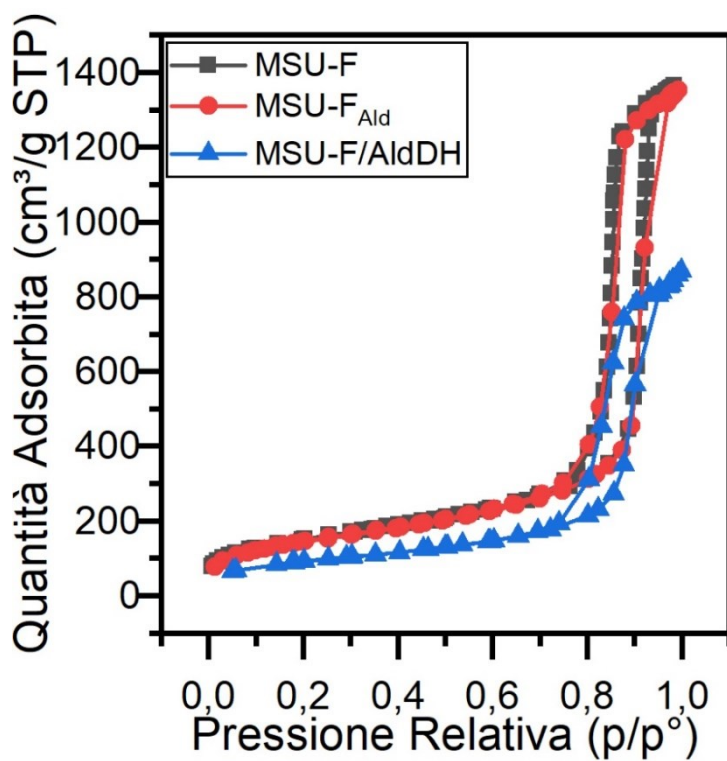


Figura 3.6 Isteresi MSU-F vs MSU-F/ADH vs MSU-F_{ald}

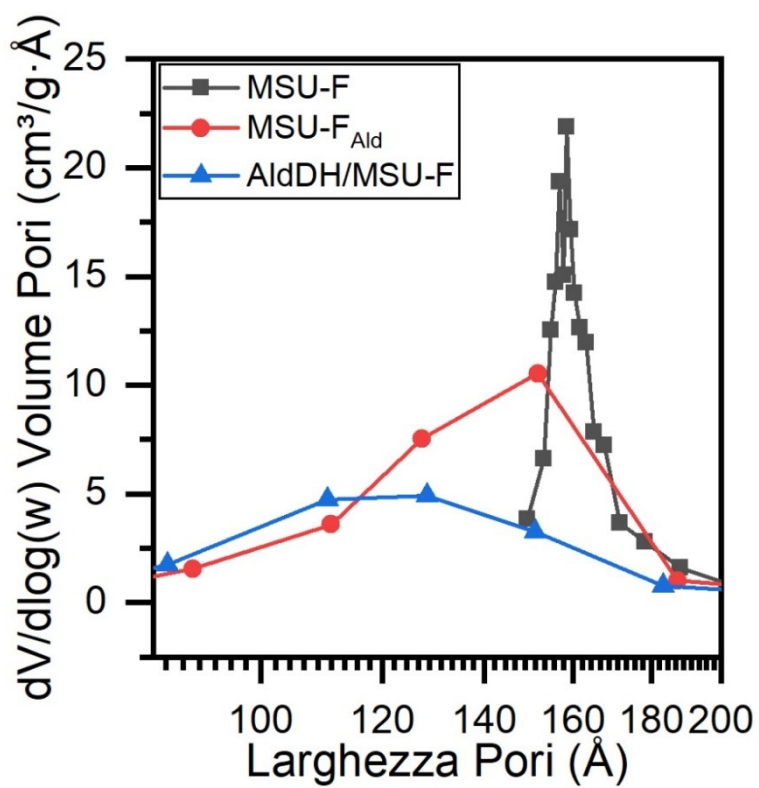


Figura 3.7 Isteresi MSU-F vs MSU-F_{ald} vs AldDH/MSU-F

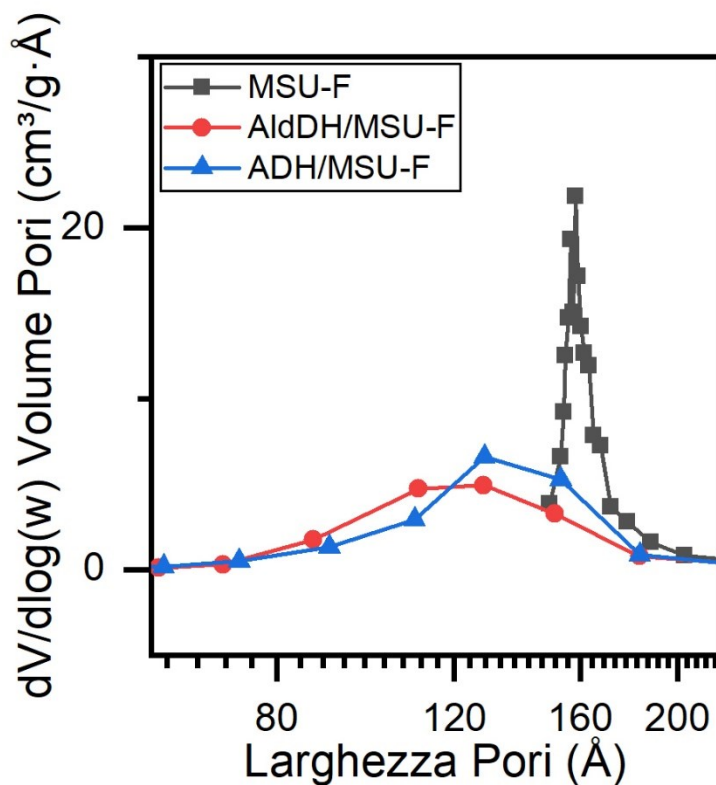


Figura 3.8 Distribuzione dimensione dei pori MSU-F vs AldDH/MSU-F vs ADH/MSU-F

In tabella vengono riportati i valori trovati tramite le prove BET, dove risulta più apprezzabile la diminuzione di area superficiale dopo funzionalizzazione ed immobilizzazione degli enzimi e la parziale perdita di volume dovuta all'occlusione dei pori.

Tabella 3.1 Proprietà supporti MSU-F e MCF 0.75

Supporti	S_{BET} (m ² /g)	V_p (cm ³ /g)	D_p (cm ³ /g)
MSU-F	538	2,3	16
MSU-F _{ald}	509	2,1	
MSU-F/ADH	409	1,6	
MSU-F/AldDH	323	1,2	
MCF 0.75	753	1,5	25
MCF 0.75 _{gly}	565	1,2	
MCF 0.75/ADH	392	1	
MCF 0.75/AldDH	427	1,1	

3.1.2 Analisi FE-SEM

Di seguito sono riportate le immagini FE-SEM dei supporti silicei mesoporosi commerciali MSU-F (figura 3.6-3.7), MSU-H (figura 3.8-3.9), sintetizzato MCF 0.75 (figura 3.10-3.11) e della zeolite naturale(Clinoptilolite) (figura 3.12-3.13)

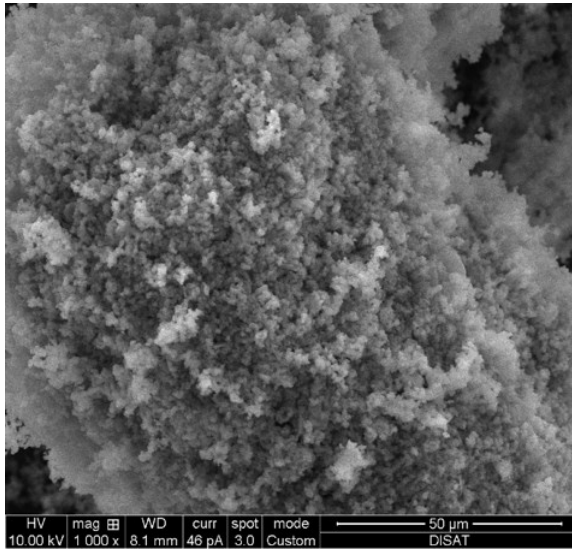


Figura 3.9 MSU-F 50 μm

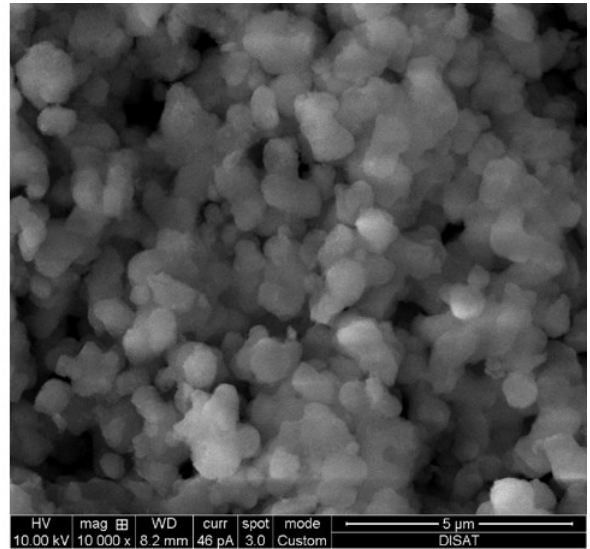


Figura 3.10 MSU-F 5 μm

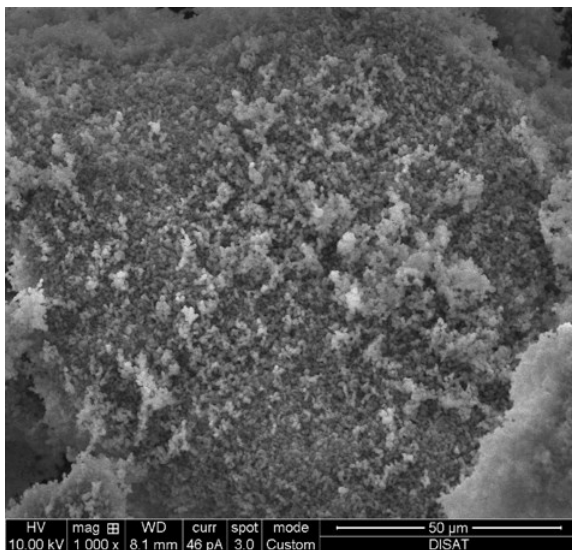


Figura 3.11 MSU-H 50 μm

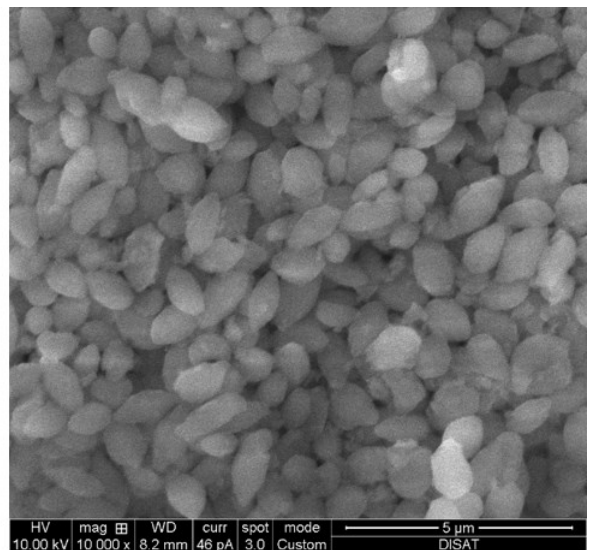


Figura 3.12 MSU-H 5 μm

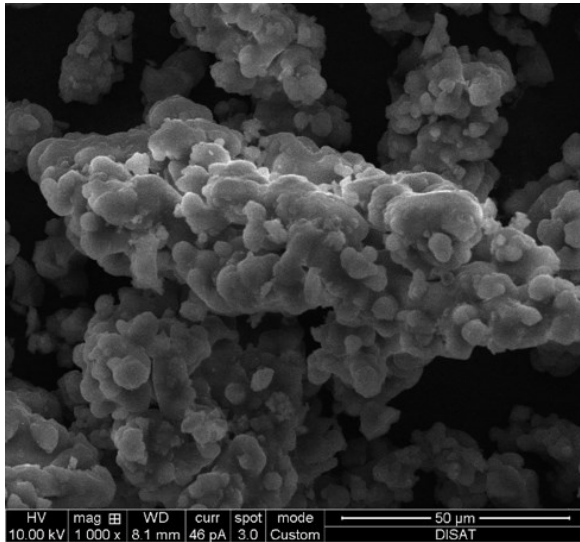


Figura 3.13 MCF 0.75 50 μm

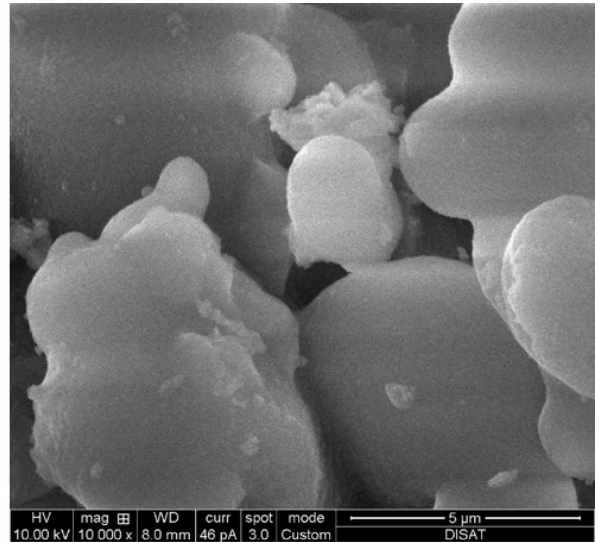


Figura 3.14 MCF 0.75 5 μm

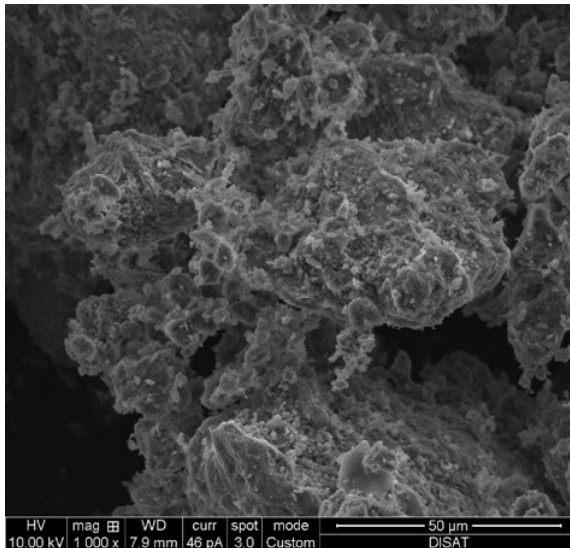


Figura 3.15 Clinoptilolite 50 μm

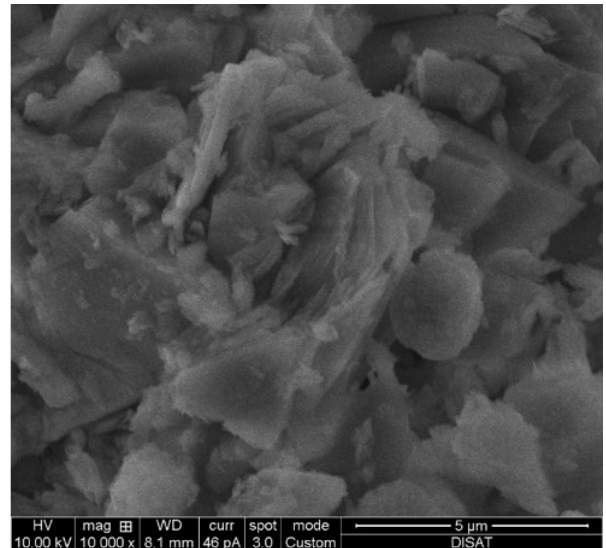


Figura 3.16 Clinoptilolite 5 μm

Dalle figure 3.6, 3.8, 3.10 si può notare come i materiali formano degli agglomerati, mentre per la zeolite naturale (figura 3.12 e 3.13) si osserva una struttura lamellare. Invece per il supporto sintetizzato MCF 0.75 si evidenzia dalla figura 3.10 una struttura “spugnosa” dove si può notare l’irregolarità dei pori.

3.2 Attività enzimatica

Nella tabella seguente (Tabella 3.2) vengono riportati i valori dell'attività enzimatica sui vari supporti, dell'attività residua rispetto all'enzima libero e della resa d'immobilizzazione.

Si può notare come per entrambi gli enzimi i supporti migliori siano MSU-H e MSU-F, che hanno dimensioni dei pori più simili a quelle dell'enzima. Per il supporto MSU-H che ha dimensioni paragonabili a quelle dell'ingombro si raggiungono i risultati migliori in termini di attività, questo è dovuto all'ottima immobilizzazione all'interno dei pori di parte dell'enzima e all'immobilizzazione sulla superficie esterna di parte dell'enzima che rende così più attivo il sistema supporto ed enzima.

Con MCF 0.75 si raggiungono risultati peggiori, ciò potrebbe essere dovuto alla struttura del supporto e alla dimensione dei pori più grande che non permette la formazione di legami stabili con l'enzima.

Per quanto riguarda la Zeolite invece, il problema della scarsa attività residua potrebbe essere spiegato dalla chimica del supporto che è dotato di gruppi acidi, i quali potrebbero disattivare in parte la proteina o non rendono possibile la formazione di un legame stabile nel tempo. Infatti per Zeolite ed MCF 0.75 si è osservata una disattivazione molto rapida dell'enzima, si è registrata attività nulla dopo un solo giorno di conservazione alla temperatura di 4°C

Complessivamente si può notare che le attività relative di tutti i biocatalizzatori siano inferiori al 30% circa, quindi una volta immobilizzato l'enzima perde parte della sua attività. Ciò può essere spiegato dalla denaturazione dell'enzima dopo all'immobilizzazione, i legami covalenti che si vengono a creare tra supporto ed enzima potrebbero modificare la struttura tridimensionale e perciò diminuire l'attività modificando i siti attivi. Un'ulteriore causa potrebbe essere l'irrigidimento della proteina causato dall'immobilizzazione all'interno dei pori, limitando i cambiamenti strutturali e quindi l'attività. Infine un'altra causa potrebbe essere legata a problemi relativi alla diffusione del substrato nei pori dovuti all'ostruzione da parte dell'enzima e alla distanza dalla superficie esterna.

I risultati riportati in tabella 3.2 mostrano come due materiali simili come MSU-H e MSU-F hanno diverse attività residue. La differenza è nella grandezza dei pori, dove anche se MSU-F presenta una resa di immobilizzazione maggiore ($IY_p = 100\%$) rispetto a MSU-H ($IY_p = 82\%$) l'attività residua è più alta per MSU-H che ha una dimensione dei pori confrontabile con l'ingombro dell'enzima. Questo può essere la conferma delle cause sopra elencate, ed è anche possibile che una maggiore quantità di enzima si sia immobilizzata esternamente.

Tabella 3.2 Proprietà supporti immobilizzati

Supporto	Attività (IU/g supporto)	Attività Residua (%)	IY (%)	S _{BET} supporto (m ² /g)
ADH/MSU-H	48	27	82	750
ADH/MSU-F	12	7	100	538
ADH/MCF 0.75	4	2	100	753
ADH/Zeolite	3	1	100	36
AldDH/MSU-H	1	34	50	750
AldDH/MSU-F	0,77	26	96	538
AldDH/MCF 0.75	0,25	8	100	753
AldDH/Zeolite	0,11	4	100	36

3.3 Caratterizzazione pH e Temperatura ottimale

Poiché gli enzimi sono polimeri poliionici, ci si aspetta che il pH influenzi la maggior parte delle loro proprietà. Infatti, la variazione del pH può modificare la distribuzione delle cariche nel sito attivo e in tutta la superficie della molecola proteica. Gli enzimi possono presentare residui di amminoacidi polari nel loro sito attivo la cui carica dipende dal pH.

La temperatura è la variabile più rilevante in qualsiasi sistema biologico. Ciò è particolarmente vero per i processi enzimatici. Gli enzimi sono proteine labili complesse e la biocatalisi si riferisce al suo utilizzo in condizioni non naturali, dove le sue proprietà native possono essere significativamente alterate. È prevedibile quindi che la temperatura avrà un profondo impatto non solo sull'attività enzimatica ma anche sulla stabilità enzimatica. Distintamente dal pH, la temperatura esercita effetti opposti sull'attività e sulla stabilità dell'enzima. Un aumento della temperatura aumenta la velocità della reazione chimica che viene catalizzata mentre aumenta anche la velocità con cui l'enzima viene inattivato, creando un compromesso

Dai grafici riferiti all'AldDH immobilizzato si nota un incremento per la temperatura ottimale (figura 3.18), raggiungendo i 50 °C con MSU-F. Questo conferma una buona immobilizzazione e la creazione di un microambiente che protegge l'enzima.

Invece con MSU-H non c'è alcun incremento nella temperatura ottimale, ma l'attività resta leggermente più elevata in un range di temperature più ampio. Dopo i 60 °C si ha un collasso dell'attività, comportamento analogo a quello dell'enzima libero.

Invece per quanto riguarda il pH ottimale (figura 3.17) non vi è alcun cambiamento, il profilo ha la stessa forma per enzima libero e immobilizzato, l'unica differenza riguarda una migliore stabilità per pH diversi da quello ottimale. Differenza più marcata nel caso di MSU-F.

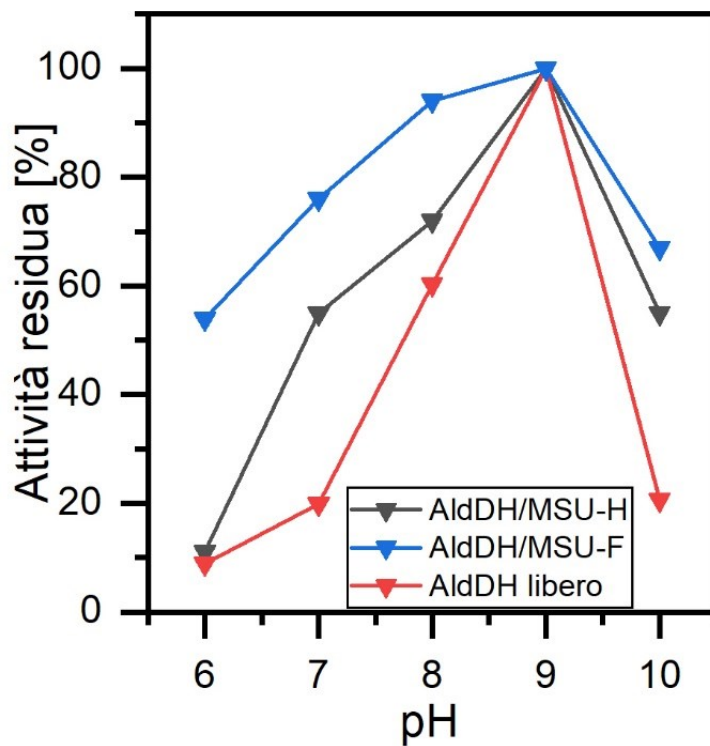


Figura 3.17 pH ottimale AldDH

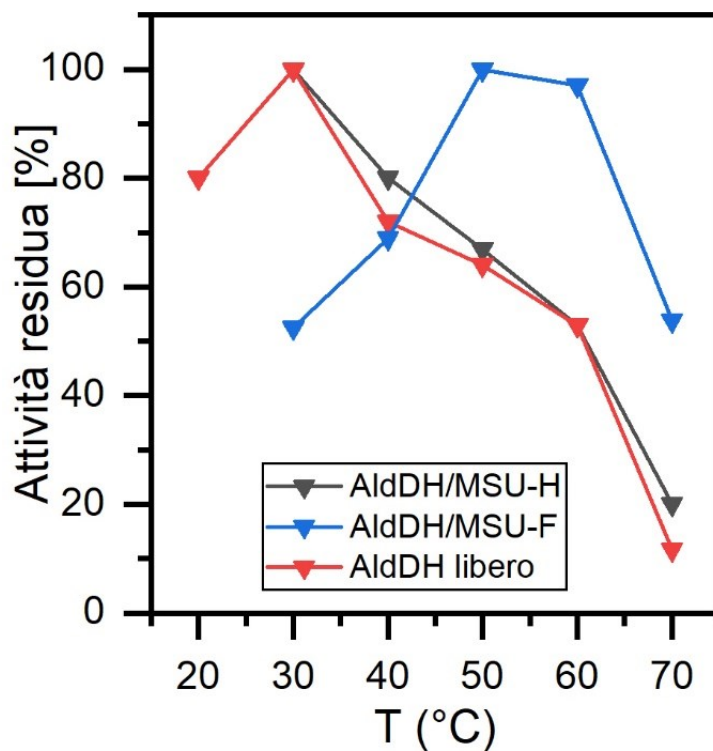


Figura 3.18 Temperatura ottimale AldDH

Le figure (figure 19 e 20) che seguono riguardano l'attività dei biocatalizzatori con ADH, sia il profilo di pH che di temperatura rimangono costanti mostrando come nel caso

precedente una migliore stabilità generale per T e pH diversi da quello ottimale rispetto all'enzima libero.

L'unica differenza si ha per il pH ottimale di ADH su MSU-H che risulta essere a 10, per stabilirlo è stata svolta una prova aggiuntiva a pH 11 per verificare la decrescita dell'attività.

In letteratura si è riscontrato un comportamento simile in un microambiente con gruppi amminici, dove ADH è stato immobilizzato su agarosio [1] e FDH su zeolite naturale [2]. I profili che sono stati ricavati indicano che gli enzimi immobilizzati sono meno affetti dai cambiamenti di pH e temperatura, confermando come l'immobilizzazione migliori queste proprietà.

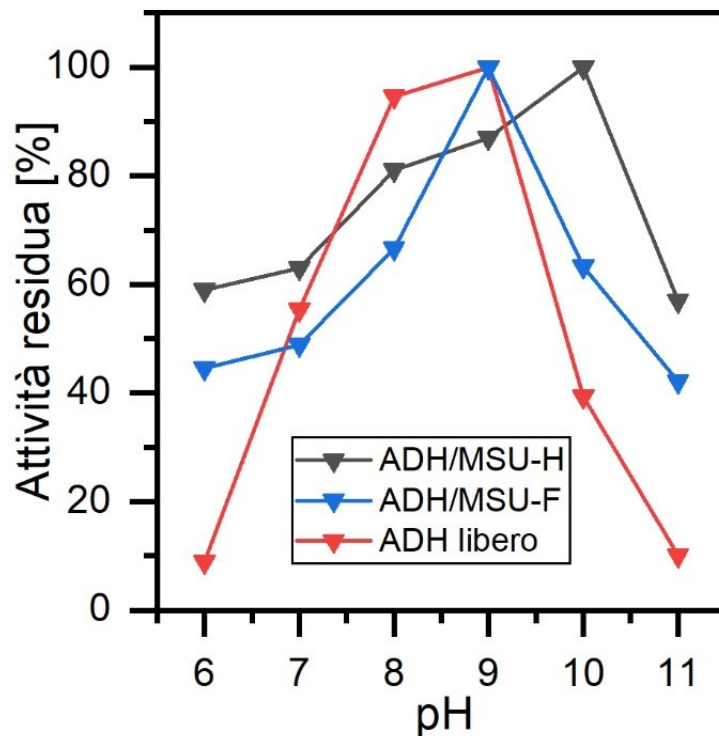


Figura 3.19 pH ottimale ADH

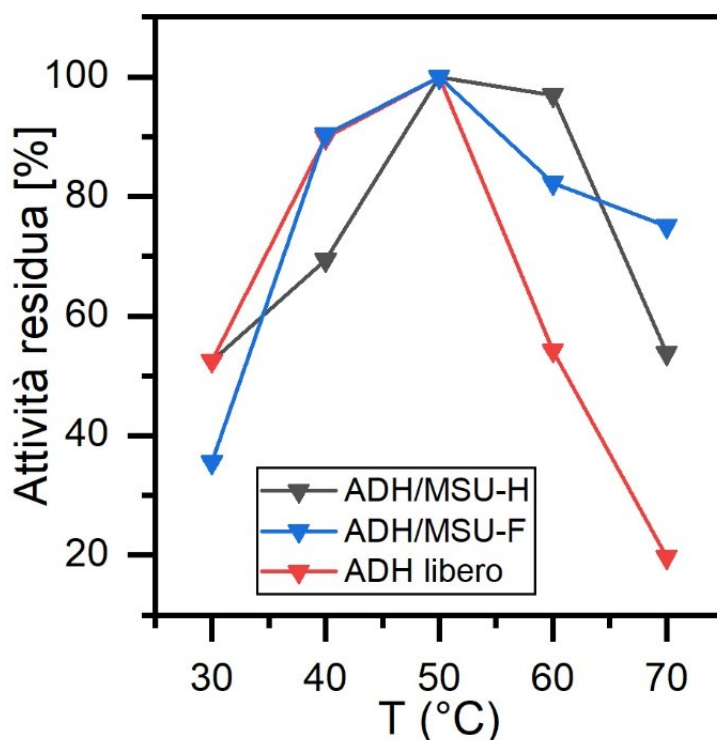


Figura 3.20 Temperatura ottimale ADH

Dai profili di pH e temperatura ricavati si può osservare una stabilità generalmente migliore per MSU-F a conferma del fatto che l'immobilizzazione è avvenuta dentro i pori andando così a creare un microambiente che protegge meglio l'enzima. Invece per l'MSU-H l'enzima si immobilizza in maggior parte esternamente, avendo una dimensione dei pori minore, mostrando proprietà intermedie al supporto MSU-F e l'enzima libero. In tabella vengono riassunti pH e T ottimale per i supporti analizzati.

Tabella 3.3 Temperatura e pH ottimale

Supporto	T ottimale (°C)	pH ottimale
AldDH	30	9
AldDH/MSU-F	50	9
AldDH/MSU-H	30	9
ADH	50	9
ADH/MSU-F	50	9
ADH/MSU-H	50	10

3.4 Stabilità termica

Non è stato possibile eseguire le prove di stabilità termica per MCF 0.75 e Clinoptilolite in quanto si è vista una perdita di attività nei giorni successivi all'immobilizzazione alla temperatura di 4°C (conservazione in frigorifero dell'enzima immobilizzato)

Dopo le prove di caratterizzazione degli enzimi immobilizzati si è scelto di eseguire i test di reazione su MSU-H e MSU-F in quanto hanno mostrato risultati migliori in termini di attività e stabilità.

I grafici (figura 21 e 22) mostrano i risultati dei test di stabilità termica eseguiti per l'enzima ADH e AldDH immobilizzati sui supporti MSU-F e MSU-H, supporti che hanno dato risultati migliori in termini di attività residua e conversione. Per la descrizione dei dati sperimentali si è utilizzato un modello cinetico di disattivazione del primo ordine senza attività residua per ADH libero e per AldDH sia libero che immobilizzato. Invece per ADH/MSU-H è stato utilizzato un modello del primo ordine con attività residua. I valori di K_d (costante cinetica della velocità di disattivazione termica), $t_{1/2}$ (tempo di dimezzamento), R^2 (coefficiente di determinazione del modello), SF (fattore di stabilità) e il parametro alfa (il rapporto tra lo stato finale ed iniziale) si può ottenere solo per i modelli con attività residua sono riportati in tabella.

L'enzima ADH libero mostra attività nulla dopo 24 ore, dando una costante di disattivazione di 0.28 h^{-1} che corrisponde ad un tempo di dimezzamento di 2.47 h. Invece ADH immobilizzato su MSU-F mostra un importante miglioramento nella stabilità poiché l'attività resta costante per 120 ore. Questo è un ulteriore conferma che l'immobilizzazione è avvenuta dentro i pori rendendola più stabile e limitando il mass transfer. Quando l'enzima presente nella parte più esterna del supporto si disattiva, il substrato riesce ancora a reagire con l'enzima contenuto all'interno dei pori, che prima non riusciva a raggiungere. Per questo non è stato possibile ottenere una costante di disattivazione e il tempo di dimezzamento.

Per il biocatalizzatore ADH/MSU-H, è stata trovata un'attività residua del 40% circa dopo 120 h. Si ricava perciò un tempo di disattivazione di 83.5 h con un fattore di stabilità di 33.8. Per AldDH libero si trova un tempo di dimezzamento di 13.86 h, mentre per AldDH/MSU-H si ottiene un tempo di 46.21 h il che corrisponde a un fattore di stabilità pari a 3.3. Contrariamente al caso precedente per AldDH immobilizzata su MSU-F si trova un fattore di stabilità minore e pari a 2 in questo caso.

I dati ricavati confermano come i supporti silicei mesoporosi siano particolarmente adatti per l'immobilizzazione enzimatica.[3]

La disattivazione termica dell'enzima deriva dell'indebolimento dei legami intermolecolari che definiscono la struttura tridimensionale dell'enzimi. Immobilizzando l'enzima tramite legami covalenti, si rende la proteina più rigida così che possa conservare più a lungo la struttura e di conseguenza la sua attività durante l'incubazione a 50°C .[4]

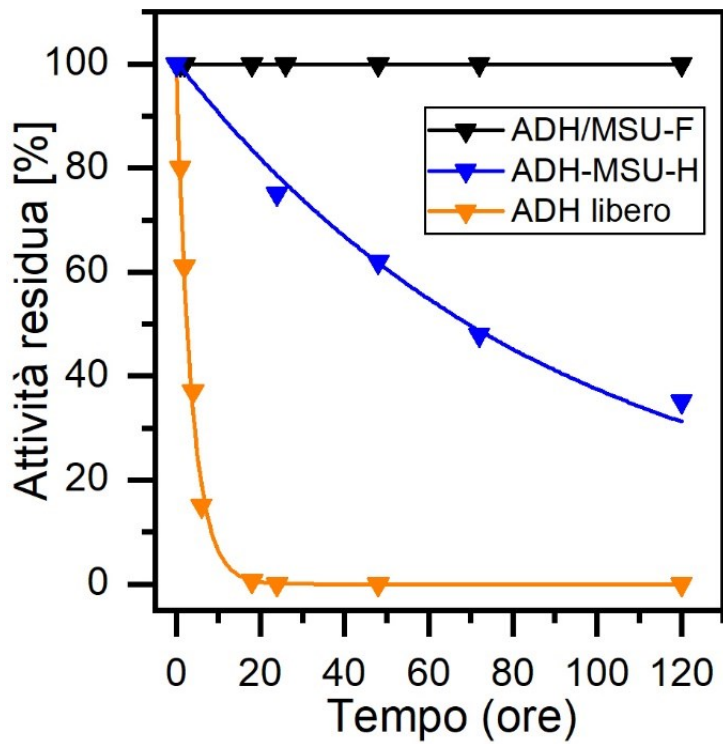


Figura 3.21 Disattivazione ADH

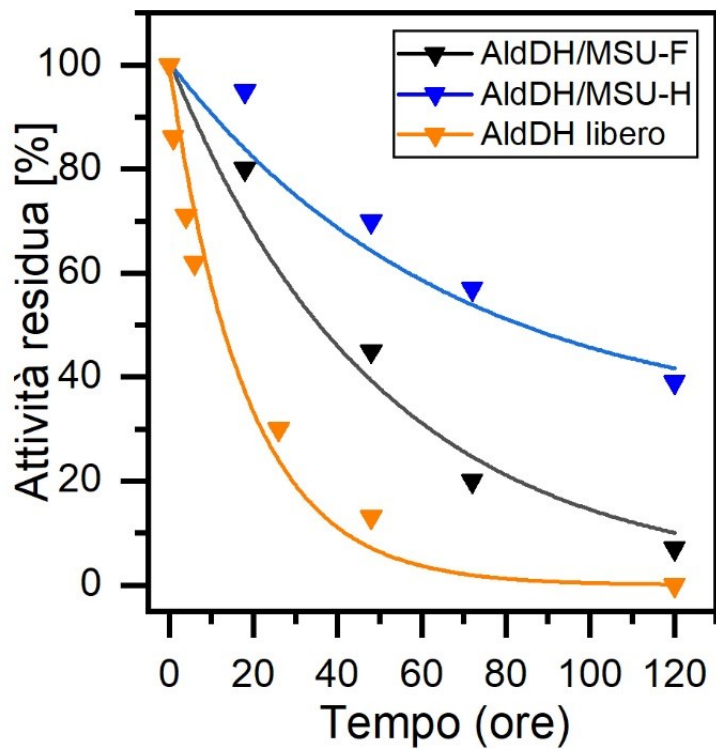


Figura 3.22 Disattivazione AldDH

Tabella 3.4 Costante di disattivazione (k_D), rapporto tra lo stato finale e iniziale dell'enzima (α), tempo di dimezzamento($t_{1/2}$) e fattore di stabilizzazione(F_S)

Campione	k_D (h^{-1})	α (-)	$t_{1/2}$ (h)	F_S (-)	R^2
ADH Libero	0.280	-	2.47	-	0.99
ADH/MSU-F	-	-	-	-	-
ADH/MSU-H	0.015	0.3	83.5	33.8	0.95
AldDH Libero	0.050	-	13.86	-	0.96
AldDH/MSU-F	0.025	0.4	27.73	2.0	0.98
AldDH/MSU-H	0.015	0.22	46.21	3.3	0.98

3.5 Reazioni

Dai processi di digestione anaerobica, la concentrazione dei grassi acidi volatili varia tra i 10 e i 100 mM, si è perciò deciso di lavorare ad una concentrazione intermedia di acido propionico o propionaldeide di 50 mM, usando il NADH in rapporto stechiometrico. Sono state eseguite ulteriori prove ad una concentrazione di NADH minore ottenendo risultati peggiori.

La reazione di riduzione è stata eseguita a 30°C e pH neutrale, nonostante gli ottimali siano maggiori come descritto nel paragrafo precedente, per evitare la disattivazione del NADH.

La reazione è stata studiata prima con i due enzimi separati immobilizzati su MSU-H e MSU-F e poi in serie.

Per l'enzima AldDH vengono registrate concentrazioni di propionaldeide di 0,21 μ M dopo un tempo di reazione di 4,5h, anche se si registra una decrescita di NADH del 30% circa. Probabilmente il coenzima viene adsorbito sul supporto e non partecipa alla reazione. Si è giunti a questa conclusione osservando una variazione di assorbanza nel tempo legata al consumo di NADH in una soluzione dove è stato usato il supporto privo dell'enzima.

Tabella 3.5 Risultati conversione AldDH

Supporto	Concentrazione (ppm)	Concentrazione (microM)	Conversione (%)
AldDH/MSU-H 50 mM	0,011	0,07	<0.1
AldDH/MSU-H 20 mM	0,004	0,206	<0.1
AldDH/MSU-F 50 mM	0,004	0,079	<0.1

Come riportato in letteratura l'enzima ADH risulta essere molto attivo nella reazione di conversione dell'aldeide al suo corrispettivo alcol [5], con il supporto MSU-F però si è misurata una bassa conversione anche se la decrescita del NADH era maggiore del 40%. Invece con il supporto MSU-H si è arrivati ad una conversione tre ordini di grandezza superiore, ottenendo una conversione del 14%.

Tabella 3.6 Risultati conversione ADH

Supporto	Concentrazione (ppm)	Concentrazione (microM)	Conversione (%)
ADH/MSU-H 50 mmM	423,7	7049	14,1
ADH/MSU-H 20 mmM	0,7	11,7	<0,1
ADH/MSU-F 50 mmM	0,074	1,23	<0,1

Con i due enzimi in serie entrambi immobilizzati su MSU-H o MSU-F, si osserva un leggero incremento nella produzione di propionaldeide e in entrambi i casi si ottengono tracce di propanolo. Lo step controllante della reazione è rappresentato dall'AldDH che risulta avere una bassa attività anche quando non è immobilizzato su un supporto.

Tabella 3.7 Risultati conversione ADH e AldDH in serie

Supporto	Concentrazione (ppm)	Concentrazione (microM)	Conversione (%)
Serie/MSU-H 50 mmM	0,011	0,053	<0.1
Serie/MSU-H 20 mmM	0,002	0,037	<0.1
Serie/MSU-F 50 mmM	0,002	0,04	<0.1

In generale si sono sempre ottenuti risultati migliori con il supporto MSU-H poiché l'immobilizzazione risulta aver luogo in superficie inibendo meno l'attività dell'enzima.

3.6 Riutilizzo

Sono state svolte delle prove di riutilizzo degli enzimi ADH e AldDH immobilizzati su MSU-H e i risultati vengono riportati in figura 3.23. Per ogni ciclo il sistema immobilizzato è stato fatto reagire come descritto nel paragrafo 2.7.2 ed è stata poi valutata l'attività confrontandola con la prima reazione. Si può notare come l'attività resti ben conservata per i primi 3 cicli per entrambi gli enzimi, andando poi a decrescere rapidamente per gli ultimi due. Risultano essere comunque valori promettenti per possibili studi e sviluppi futuri.

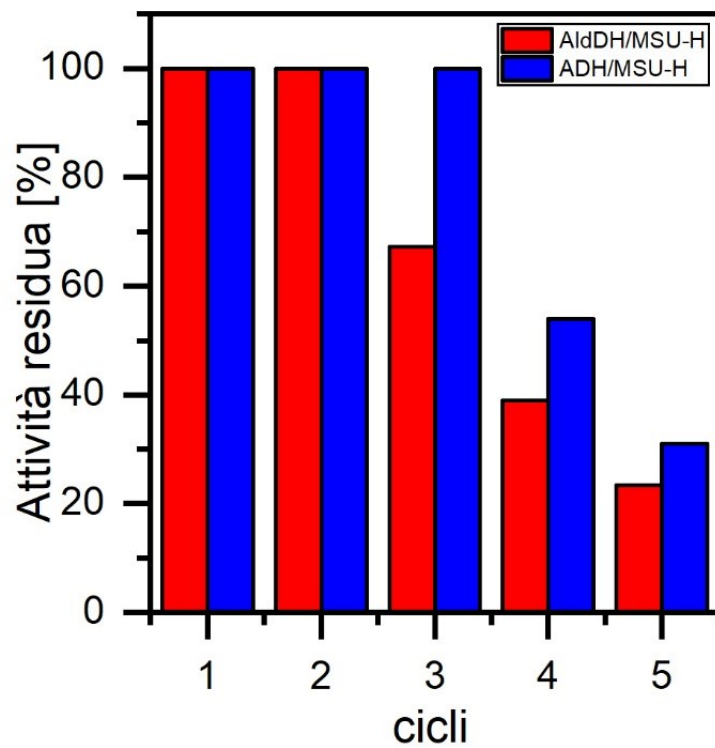


Figura 3.23 Attività residua cicli di riutilizzo

4.Lavori Futuri

Come si è dimostrato in questo progetto, l'enzima ADH risulta avere ottime prestazioni in termini di conversione anche nella reazione inversa rispetto a quella che svolge normalmente nelle cellule di *Saccharomyces cerevisiae*, dalle quali è stato estratto. Lo stesso discorso non si può applicare all'enzima AldDH, il quale presenta una bassa attività sia nella sua forma libera che immobilizzata. È stata però dimostrato per la prima volta la possibilità di immobilizzare questo enzima e la possibilità di convertire gli acidi carbossilici ad aldeidi.

Risulta perciò essere questo il punto debole della reazione contemporanea dei due enzimi, ma al tempo stesso la parte che può essere maggiormente studiata e approfondita per cercare di migliorare le prestazioni di questo enzima e di conseguenza della reazione complessiva. Un'opportunità potrebbe essere quella di co-immobilizzare i due enzimi sullo stesso supporto con la possibilità di incrementare l'attività catalitica poiché gli intermedi di reazione verrebbero immediatamente convertiti ai prodotti finali dal secondo enzima, in questo modo si andrebbe a ridurre le limitazioni legate al mass-transfer riducendo anche i tempi di reazione[6].

In questo studio si è confermato come le silici mesoporose rappresentino un ottimo supporto per l'immobilizzazione enzimatica, ma in studi più approfonditi si potrebbe ottimizzare il diametro dei pori, la grandezza e la forma degli aggregati per migliorare la resa d'immobilizzazione e l'attività enzimatica. Questi parametri del supporto sono fondamentali a causa dell'ingombro sterico dell'enzima nei pori e per le limitazioni di mass-transfer del substrato. È stato dimostrato in altri lavori come le silici mesoporose possano essere funzionalizzate in diversi modi, ad esempio MTPS (3-mercaptopropiltrimetossilano), riscontrando buone rese d'immobilizzazione e attività enzimatica[6]. Un possibile studio potrebbe quindi riguardare l'effetto delle diverse funzionalizzazioni sull'immobilizzazione dei due enzimi.

Un ulteriore step necessario per un possibile sviluppo industriale di questo processo è rappresentato dalla rigenerazione del cofattore NADH/NAD⁺, in quanto risulta essere molto costoso. È perciò fondamentale la rigenerazione tramite elettrodi o con enzimi specifici[5]. È stato dimostrato per il sistema di tre enzimi (FDH, F_{ald}DH e ADH) come sia aumentata la produzione di metanolo immobilizzando il cofattore NADH/NAD⁺ sullo stesso supporto[7], potrebbe essere questa una soluzione per aumentare la conversione degli acidi carbossilici ad aldeidi andando così a superare le limitazioni imposte dal primo step di reazione.

5. Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro è stata la valutazione dell'effetto dell'immobilizzazione degli enzimi ADH (alcol deidrogenasi) e AldDH (aldeide deidrogenasi) su supporti silicei mesoporosi e zeolite naturale (Clinoptilolite) funzionalizzati con gruppi aldeidici per l'AldDH e amminici per ADH. È stata pensata come serie per una reazione in cascata che convertisse acidi carbossilici derivanti dalla digestione anaerobica ai loro rispettivi alcol. La scelta del supporto migliore, la stabilità termica e la caratterizzazione del pH e temperatura ottimale sono state fatte con la reazione:

$\text{Etanolo} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Acetaldeide} + \text{NADH} + \text{H}^+$ per l'ADH

$\text{Propionaldeide} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Acido Propionico} + \text{NADH} + \text{H}^+$ per l'AldDH.

Sono stati utilizzati 4 supporti diversi classificabili in base alla struttura: pori cilindrici con geometria esagonale con diametro medio dei pori 7 nm (MSU-H), struttura spugnosa formata da sfere interconnesse con diametro medio dai 15 ai 25 nm (MSU-F e MCF 0.75) e struttura lamellare (Clinoptilolite).

Sono state riscontrate rese d'immobilizzazione del 100% per i supporti con D_p maggiore della dimensione d'ingombro dell'enzima, ma le attività residue più alte si sono registrate per MSU-H raggiungendo 1.3 IU per AldDH e 48.6 IU per ADH che ha D_p confrontabile con la dimensione dell'enzima. Dove probabilmente l'immobilizzazione è avvenuta all'esterno della particella riducendo così i problemi di mass transfer.

MSU-H e MSU-F sono stati selezionati per le prove successive in quanto presentavano le migliori attività residue e non davano problemi di disattivazione enzimatica riscontrati per gli altri supporti.

È sempre stato utilizzato lo stesso carico enzimatico per l'immobilizzazione di 4 mg/g, è stata valutata la stabilità termica a 50°C per 120h, riscontrando un'ottima stabilità per MSU-F (100%) e una più scarsa per MSU-H (40%) per l'ADH. Situazione opposta per l'AldDH dove per MSU-F si ha 10% e per MSU-H 45%, generalmente migliori degli enzimi liberi che risultano completamente disattivati a 120 h.

È stato caratterizzato il complesso enzima e supporto trovando pH e temperatura ottimale per MSU-F e MSU-H e sono state fatte anche delle prove di riutilizzo del biocatalizzatore. Utilizzando ADH/MSU-H è stato possibile ottenere una buona concentrazione di propanolo (7mM) che corrisponde ad una conversione del 14%. Per ottenere valori più elevati di conversione i due enzimi potrebbero essere utilizzati insieme, come provato a fare, andando però ad ottimizzare il primo step che rappresenta il rate determining step della reazione. Oltre a ciò i due enzimi potrebbero essere coimmobilizzati sulla stessa particella di supporto per diminuire le limitazioni legate al mass transfer. L'utilizzo dell'enzima CAR potrebbe essere un modo per aumentare la produzione di aldeide ottenute nel primo step. Questo enzima, estraibile da diversi microrganismi, utilizza un secondo cofattore, l'ATP bisognerebbe però in questo caso sviluppare un processo in cui si riesca a rigenerare l'ATP per rendere il processo più sostenibile.

Bibliografia

- [1] C. Ottone, C. Bernal, N. Serna, A. Illanes, and L. Wilson, “Enhanced long-chain fatty alcohol oxidation by immobilization of alcohol dehydrogenase from *S. cerevisiae*,” pp. 237–247, 2018.
- [2] G. Pietricola, C. Ottone, D. Fino, and T. Tommasi, “Enzymatic reduction of CO₂ to formic acid using FDH immobilized on natural zeolite,” *J. CO₂ Util.*, vol. 42, p. 101343, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jcou.2020.101343.
- [3] G. Pietricola *et al.*, “Synthesis and characterization of ordered mesoporous silicas for the immobilization of formate dehydrogenase (FDH),” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 177, pp. 261–270, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.114.
- [4] I. Andrés, *Enzyme Biocatalysis, principles and application*. .
- [5] F. Marpani, M. Pinelo, and A. S. Meyer, “Enzymatic conversion of CO₂ to CH₃OH via reverse dehydrogenase cascade biocatalysis: Quantitative comparison of efficiencies of immobilized enzyme systems,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 127. Elsevier B.V., pp. 217–228, 2017, doi: 10.1016/j.bej.2017.08.011.
- [6] P. S. Nabavi Zadeh, M. Zezzi Do Valle Gomes, B. Åkerman, and A. E. C. Palmqvist, “Förster Resonance Energy Transfer Study of the Improved Biocatalytic Conversion of CO₂ to Formaldehyde by Coimmobilization of Enzymes in Siliceous Mesostructured Cellular Foams,” *ACS Catal.*, vol. 8, no. 8, pp. 7251–7260, 2018, doi: 10.1021/acscatal.8b01806.
- [7] R. O. and B. C. Dave*, “Enzymatic Conversion of Carbon Dioxide to Methanol: Enhanced Methanol Production in Silica Sol–Gel Matrices,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 51, pp. 12192–12193, Dec. 1999, doi: 10.1021/JA991899R.