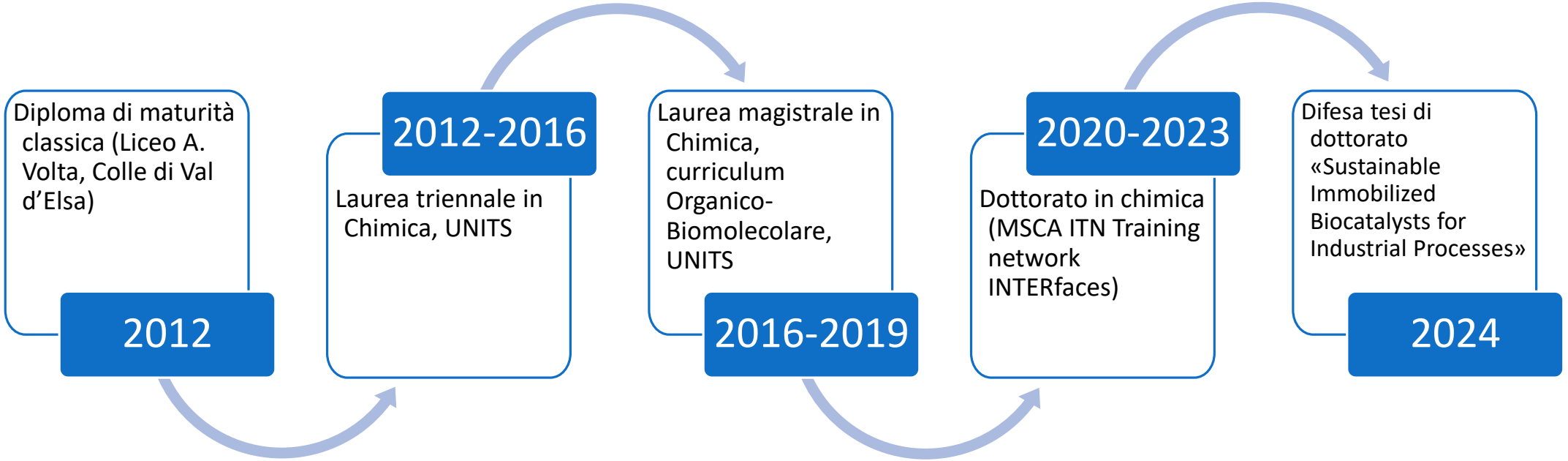
Lezione 09/04/2025

DR. CHIARA DANIELLI

Percorso di studi



Percorso di studi

2012-2016

Laurea triennale in Chimica, UNITS

- Tesi di laurea «Risoluzione cinetica enzimatica di alcoli omoallilici», relatrice: prof. Patrizia Nitti
- Utilizzo di lipasi immobilizzata (Novozym 435)

2016-2019

Laurea magistrale in Chimica, UNITS

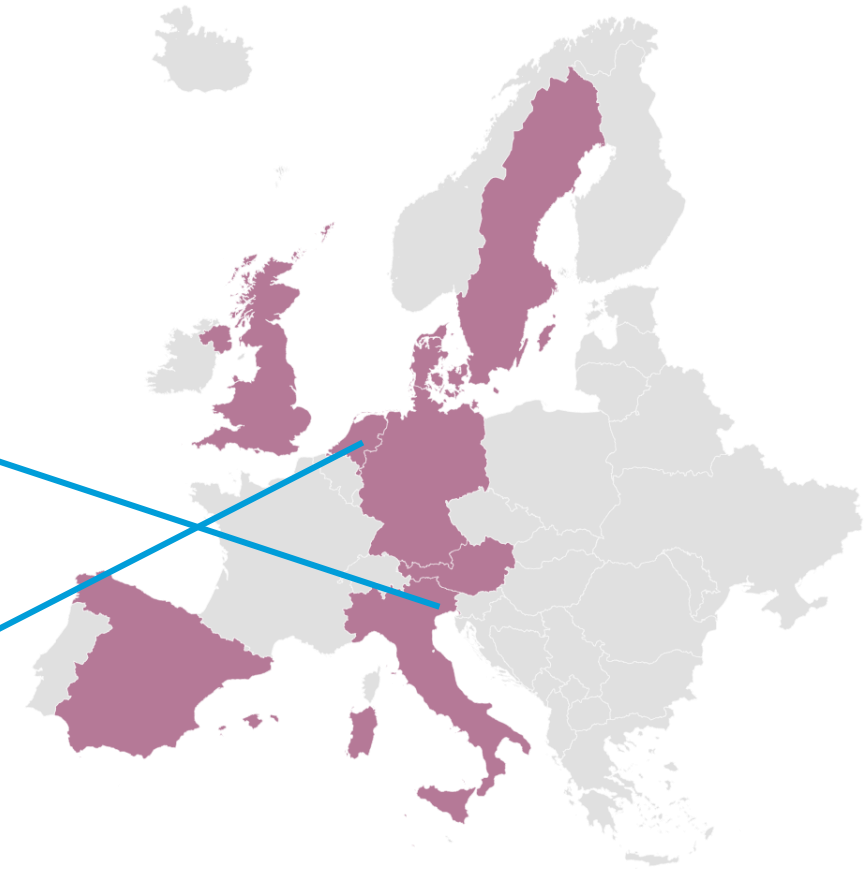
- Tesi di laurea «Sintesi e caratterizzazione di nanovettori autoassemblanti per applicazioni avanzate in nanomedicina», relatrice: prof. Fulvia Felluga
- Tesi di sintesi organica
- Pubblicazione: M. Russi et al., *Eur. J. Pharm. Sci.* **2023**, *180*, 106311

2020-2023

Dottorato in chimica (MSCA ITN INTERfaces)

- Marie Curie Innovative Training Network «INTERfaces»
- Partner accademico: Università di Trieste (dottorato interateneo con Università Ca' Foscari, Venezia) – 18 mesi
- Partner industriale: ViaZym B.V. (Delft, Paesi Bassi) – 18 Mesi

Dottorato – Progetto INTERfaces



Dottorato – Progetto INTERfaces

02/2020
- Application per la posizione di dottorato
- Posizione con progetto già definito nel «consortium agreement»

03/2020
- Colloquio (online) per la posizione
- «Colloquio di lavoro», non richiedeva presentazione di progetto di dottorato

04-05/2020
- Assegnazione della posizione e firma contratto
- Contratto da lavoratore dipendente con ViaZym B.V., immatricolazione presso UNITS come dottorato senza borsa

01/07/2020
- Inizio dottorato con periodo di 6 mesi in Olanda
- Spostamenti tra Olanda e Italia ogni 6 mesi

Cosa comporta un progetto Marie Curie?

VANTAGGI

- Esperienza sia in accademia che in industria
- Ogni 4 mesi: workshop ed eventi di training interni al consorzio
- Possibilità di viaggiare frequentemente per conferenze / scuole / workshop
- Esperienza all'estero → utile per application post-doc
- Borsa di dottorato molto vantaggiosa

SVANTAGGI

- Spostamenti ogni 6 mesi tra una sede e l'altra del dottorato
  - Fondamentale organizzare bene il lavoro
  - Traslochi, affitti, ricerca alloggio…
- Burocrazia interna ed esterna al progetto
  - Report trimestrali obbligatori
  - Burocrazia per spostamenti tra sedi di lavoro (residenza, tasse, …)
- Obblighi presso l'università di appartenenza (report, presentazioni, corsi da seguire…)

Attività svolte durante il dottorato

Conferenze

- IFIB 2020 (poster)
- BioTrans 2021 (poster)
- BNCM 2021 (poster)
- EFB 2021 (poster)
- BioCat 2022 (poster)
- IBPRO 2022 (poster, **premio poster**)
- BioTrans 2023 (poster)
- NextGenBiocat 2023 (poster)

Altri eventi

Eventi per pubblico non specializzato:

- Trieste NEXT 2020 (video contribution)

Eventi università:

- UNITS Summer School 2021 (presentazione orale)
- UNITS Summer School 2022 (presentazione orale)
- UNITS Summer School 2023 (presentazione orale)

Supervisione studenti

- Supervisione tirocinio industriale Deborah Boes (ViaZym B.V.)
- Supervisione tesi magistrale di Alice Suergiu (CTF, UNITS)
- Supervisione tesi magistrale di Valentina Puppi (correlatrice, CTF, UNITS)

…ma anche…

Corsi UNITS

- *Molecular Modeling for Life Sciences* (1° anno)
- *Materie prime rinnovabili e biotrasformazioni per l'economia circolare* (1° anno)
- *Scientific Writing* (2° anno)
- *Validation of Analytical Methods and Applications in Environmental Sciences* (2° anno)

Totale: 90 ore di lezione (45 1° anno, 45 2° anno)

Scuole e workshop (INTERfaces)

- *Intellectual Property Rights, Ethics and Gender Equality Workshop* (online, 2020)
- *Material and Enzyme Design School* (online, 2021)
- *Systematic Assembly School* (online, 2021)
- *Process Engineering School* (Aarhus, DK, 2021)
- *Career Development Workshop* (Bielefeld, DE, 2022)
- *Summer Lab Course* (Oviedo, ES, 2022)
- *Innovation and Enterpreneurship Workshop* (Gran Canaria, ES, 2022)
- *Career Development Workshop (part 2)* (Graz, AT, 2023)

…più altri seminari presso l'Università di Trieste

…e dopo il dottorato?

30/06/2023
- Fine dottorato
- Consegna tesi rimandata a fine ottobre per problemi burocratici UNITS

31/10/2023
- Consegna tesi

04/12/2023
- Ricevute revisioni della tesi (2 reviewer esterni)
- Inizio correzioni

04/01/2024
- Upload definitivo tesi

12/02/2024
- Difesa tesi di dottorato

SUSTAINABLE IMMOBILIZED BIOCATALYSTS FOR INDUSTRIAL PROCESSES

Settore scientifico-disciplinare: CHIM/06 CHIMICA ORGANICA

DOTTORANDO / A
CHIARA DANIELLI

COORDINATORE
PROF. ENZO ALESSIO

SUPERVISORE DI TESI
PROF. LUCIA GARDOSSI

SUPERVISORE DI TESI
DR. LUUK VAN LANGEN

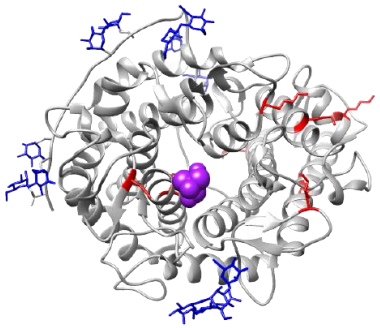
ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Immobilizzazione di enzimi

Introduzione

Enzimi

- Catalizzatori rinnovabili
- Meccanismo di azione specifico e selettivo
- Condizioni di reazione blande

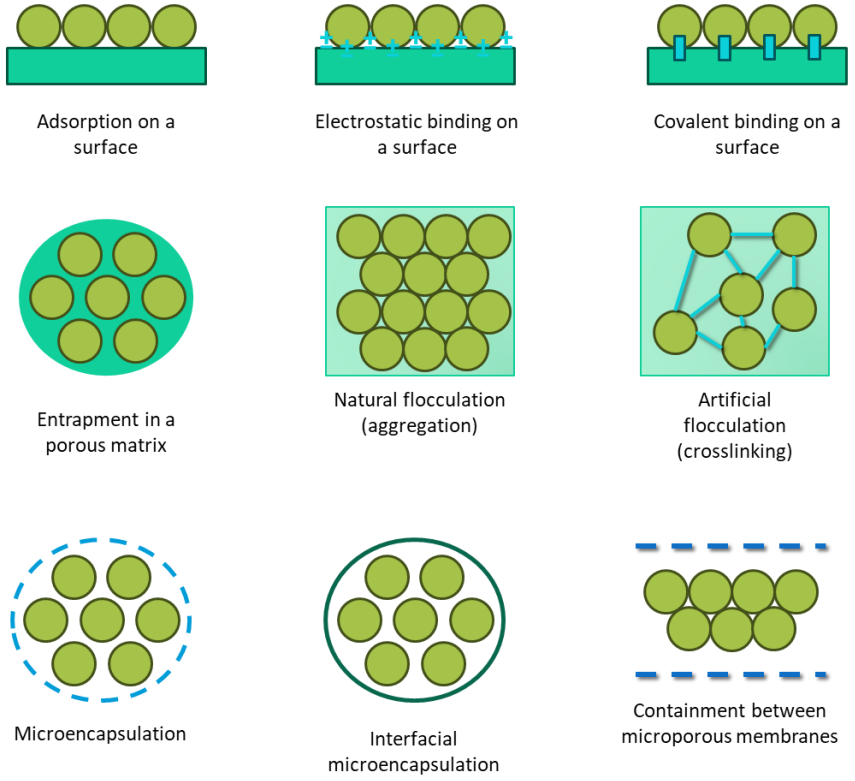


Immobilizzazione di enzimi

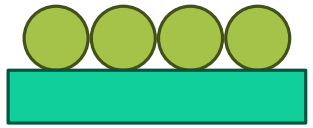
- Migliora la stabilità meccanica e chimica della proteina
- Facilità di separazione
- Facilità di riciclo

Problematiche dell'immobilizzazione

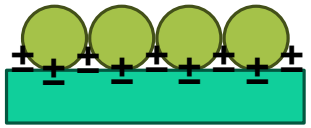
- Costo elevato del processo di immobilizzazione
  - Supporti «classici» per enzimi sono molto costosi
- Non esiste una procedura «generale» per tutti gli enzimi
- Diminuzione dell'attività catalitica
- Limiti di trasferimento di massa



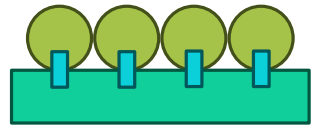
Metodi di immobilizzazione più comuni



Adsorption on a surface



Electrostatic binding on a surface

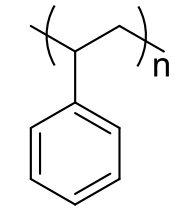


Covalent binding on a surface

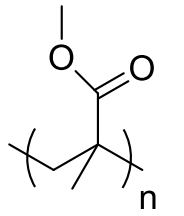
Supporti per immobilizzazione

- Supporti **organici** oppure **inorganici**
  - **Organici**: supporti polimerici, biopolimeri
  - **Inorganici**: silicati, celite
- Devono essere **chimicamente** e **meccanicamente** stabili nelle condizioni operative
- Quando l'immobilizzazione avviene tramite **legami covalenti**, il supporto deve essere **funzionalizzato** sulla propria superficie

Polimeri sintetici



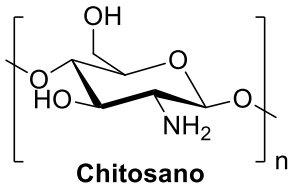
Polistirene



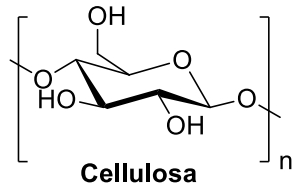
Poliacrilato

Supporti inorganici

Biopolimeri



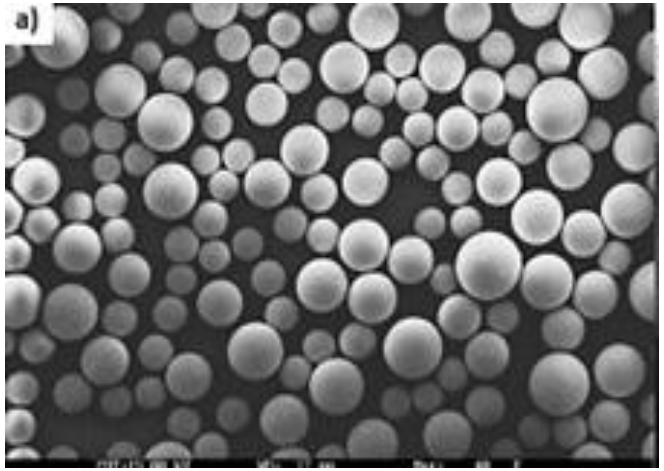
Chitosano



Cellulosa

Polimeri organici sintetici e resine

- Carrier **idrofobici** con diversi gradi di idrofobicità e porosità.
- Disponibili commercialmente
- Sintetizzati per polimerizzazione radicalica
- Altamente funzionalizzati (es. gruppi epossidici, -NH_2) per legame con enzimi
- Non rinnovabili, basati su monomeri fossili
- Alto impatto su costi del processo di immobilizzazione
- Alto impatto sulle emissioni di CO_2 legate al processo complessivo di immobilizzazione
  - 51% - 83% delle emissioni totali di gas serra del processo



Carrier metacrilico

Carrier derivati da biomassa: una soluzione?

- Materiali di scarto dell'industria agro-alimentare
  - Lolla di riso
  - Fibre di cocco
  - Gusci di noce
  - …
- Biodegradabili e riciclabili
- Basso costo
- Basso impatto ambientale
- *Non standardizzati*
- Procedure di funzionalizzazione complesse
  - Aumento dei costi di immobilizzazione

Lolla di riso (frammenti, 200-400 µm)

P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, M. Nordblad, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.*, 2011, **15**, 266-274

Supporti inorganici

- Vari solidi inorganici, es. **allumina**, **silica**, **zeoliti**, **silica mesoporosa**.
- Chimicamente inerti, stabili, non danno rigonfiamento in liquidi
- Esempi di metodi di immobilizzazione:
  - Formazione di **legami H** con superficie dell'enzima (residui amminoacidici idroficili, glicosidi)
  - Granulazione di silica (spray drying) con soluzione di enzima e binder idrosolubili)
  - Metodi semplici ed economici → utilizzo su larga scala per produzione di *bulk chemicals*
- **<u>Utilizzo in ambienti non acquosi</u>**

Celite

Diatomee

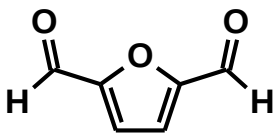
Esempio di immobilizzazione covalente

GLUCOAMILASI SU CARRIER METACRILICO

Progetto di tesi

Sustainable immobilized biocatalysts for industrial processes

Nuovo crosslinkante bio-based



2,5-diformylfuran

- Caratterizzazione
- Immobilizzazione di enzimi su carrier tradizionali (PMMA)
- Confronto sistematico con crosslinkante tradizionale (glutaraldeide)

Supporto bio-based per enzimi

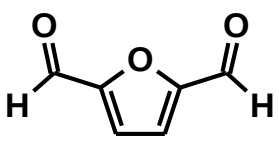
Lolla di riso

- Caratterizzazione
- Funzionalizzazione
- Immobilizzazione di enzimi
- Applicazione in condizioni rilevanti dal punto di vista industriale

Progetto di tesi

Sustainable immobilized biocatalysts for industrial processes

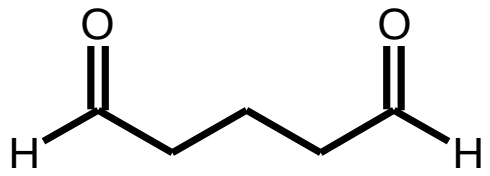
Nuovo crosslinkante bio-based

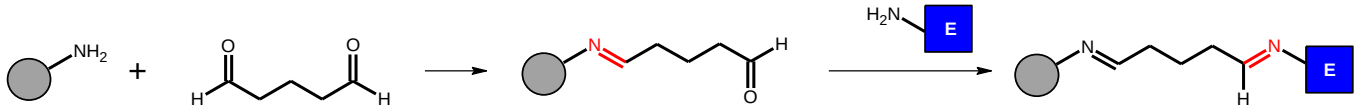


2,5-diformylfuran

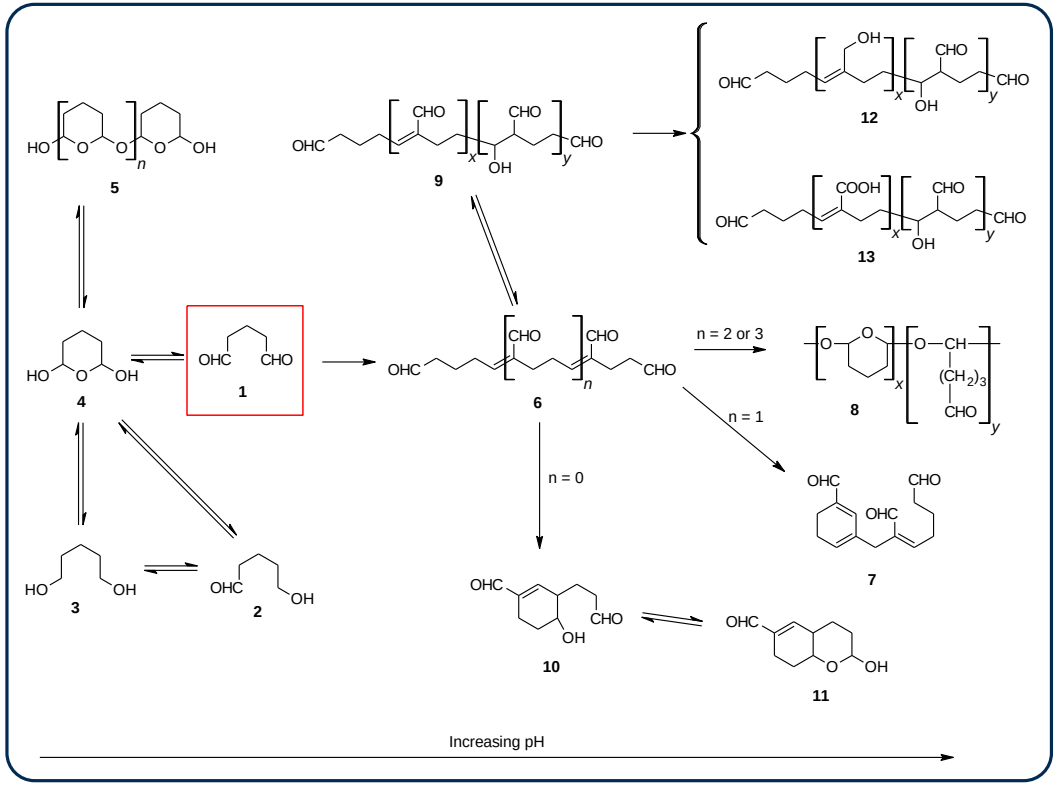
- Caratterizzazione
- Immobilizzazione di enzimi su carrier tradizionali (PMMA)
- Confronto sistematico con crosslinkante tradizionale (glutaraldeide)

Preattivazione del carrier: glutaraldeide

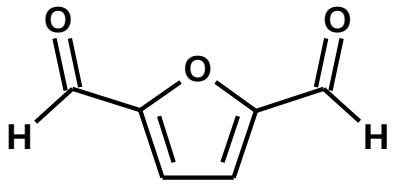




- Liquida, altamente volatile, commercializzata solo in soluzione acquosa
- Ottenuta da fonti fossili
- Valore di mercato (2021) $ 450 milioni
- Ben nota tossicità (SVHC)
  - Sensibilizzazione respiratoria
  - Tossicità occupazionale per l'operatore
  - Tossicità marina e ambientale
- Chimica molto complessa in ambiente acquoso
  - 13 forme identificate all'equilibrio
  - Non è chiaro quale forma reagisca con l'enzima nell'immobilizzazione

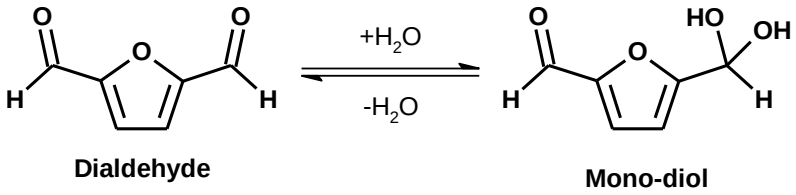


Preattivazione del carrier: 2,5-diformilfurano (DFF)



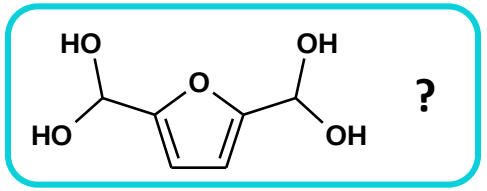
- Solido, non volatile
- Bio-based: ottenuto da disidratazione degli zuccheri
- Aldeide aromatica, planare, sistema coniugato

- Per determinare se può essere utilizzata per immobilizzazione di enzimi:
  - **Chimica in ambiente acquoso**



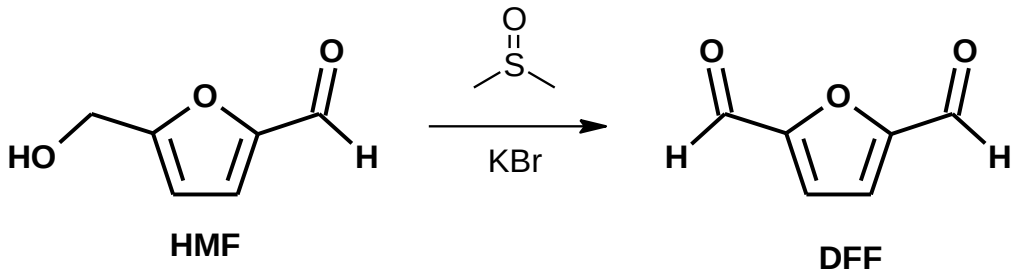
Dialdehyde

Mono-diol



  - **Reattività con ammine**
- Problema: al momento disponibile solo su scala di laboratorio, no sintasi di larga scala

Sintesi DFF



HMF DFF

Non disponibile su scala industriale

Sintesi da HMF (solo *lab scale*):

- Con sali (eg. KBr) → **Swern oxidation, KBr in DMSO, 150°C, 6h**
- Ossidazione enzimatica (alcol ossidasi, galattosio ossidasi)
- Ossidazione con cellule intere (*Fusarium culmorum*, *Pichia pastoris*)

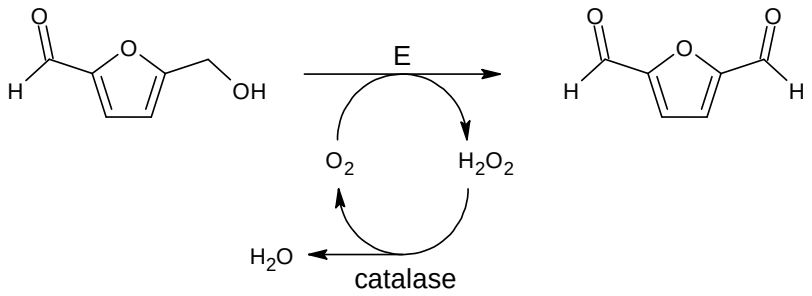
- Ossidi metallici (es. CrO_3)
- Catalisi metallica

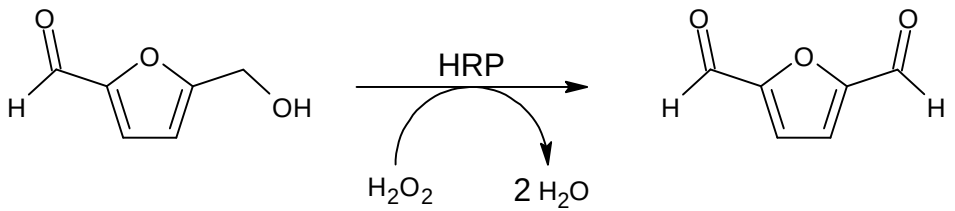
Sintesi da fruttosio (solo *lab scale*):

- Catalisi metallica
- NaBr in DMSO

A. Rosatella, S. P. Simeonov, R. F. M. Frade and C. A. M. Afonso, *Green Chem.*, 2011, **13**, 754
C. Laugel, B. Estrine, J. Le Bras, N. Hoffmann, S. Marinkovic and J. Muzart, *ChemCatChem*, 2014, **6**, 1195–1198

Sintesi enzimatica DFF – *Proof of concept*

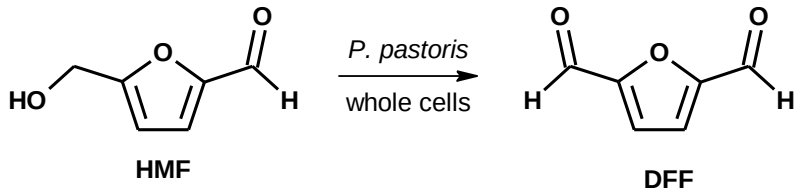




	Enzima	pH	Formazione DFF?	Note
1	Galattosio ossidasi da *D. dendroides*	6.0	SI	Richiede catalasi
2	Laccasi da *T. versicolor*	5.0	NO[a]	Richiede mediatore (TEMPO, 20 mol%)
3	Aril alcol ossidasi	6.0	SI	
4	Perossidasi da Horse radish (HRP)	6.0	NO	Aggiunti 0.5 eq H_2O_2
5	Alcol ossidasi da *P. Pastoris*	7.5	SI	Richiede catalasi

[a] **DFF** è presente in quantità minime come intermedio di reazione. Il prodotto principale di ossidazione con laccasi è l'acido furandicarbossilico (FDCA).

Sintesi di DFF con cellule intere di *Pichia pastoris – Proof of concept*

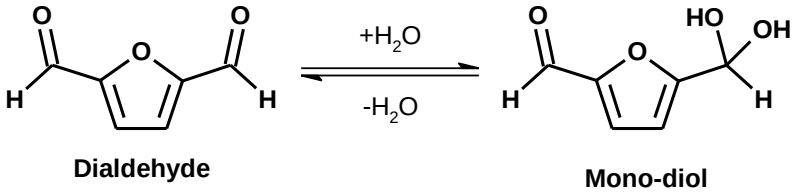


HMF DFF

	Tampone	Cosolvente	Rapporto cosolvente/tampone	Formazione DFF?
1	Kpi, 0.1 M, pH 7	–	–	YES
2	Kpi, 0.1 M, pH 7	Toluene	95:5	NO
3	Kpi, 0.1 M, pH 7	Toluene	50:50	YES
4	Kpi, 0.1 M, pH 7	Isopropyl ether	95:5	NO
5	Kpi, 0.1 M, pH 7	Isopropyl ether	50:50	YES
6	Kpi, 0.1 M, pH 7	Ethyl acetate	95:5	NO
7	Kpi, 0.1 M, pH 7	Ethyl acetate	50:50	NO

- *P. pastoris* cell concentration: 5 mg/mL
- [HMF] = 5 mg/mL
- Reaction volume = 1 mL
- 30°C, 48 hours

Comportamento di DFF in ambiente acquoso

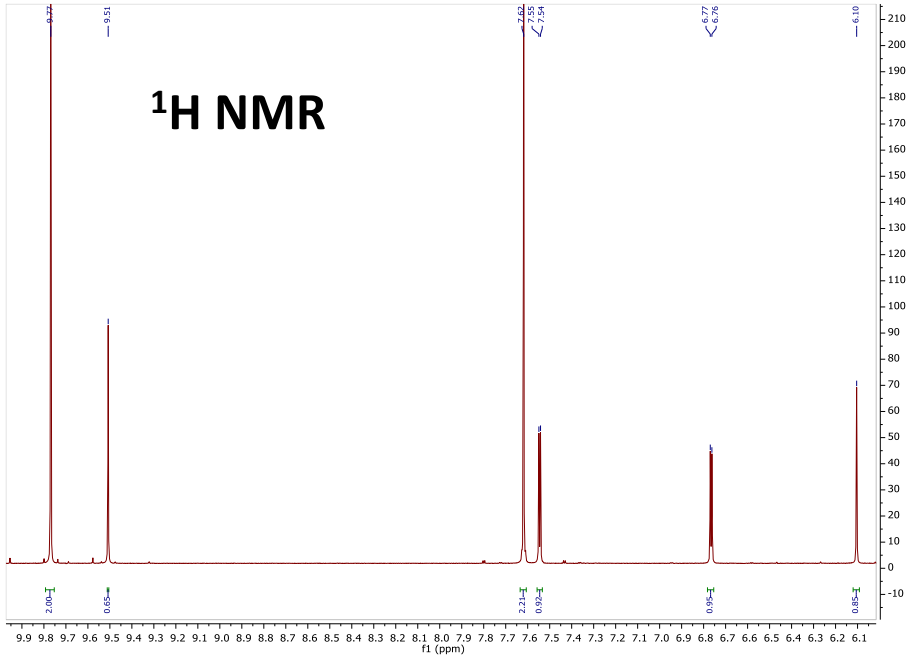


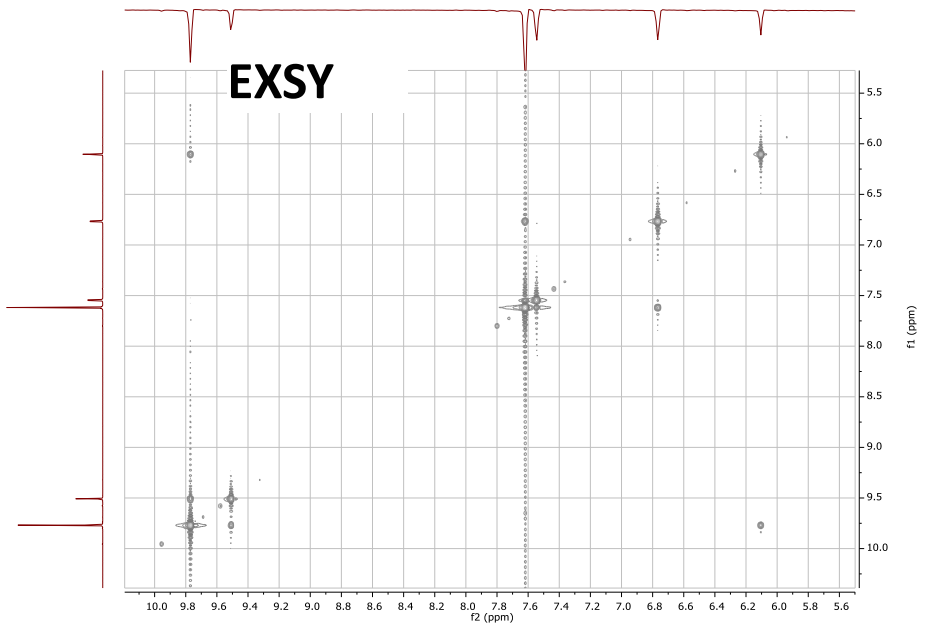
Dialdehyde

Mono-diol

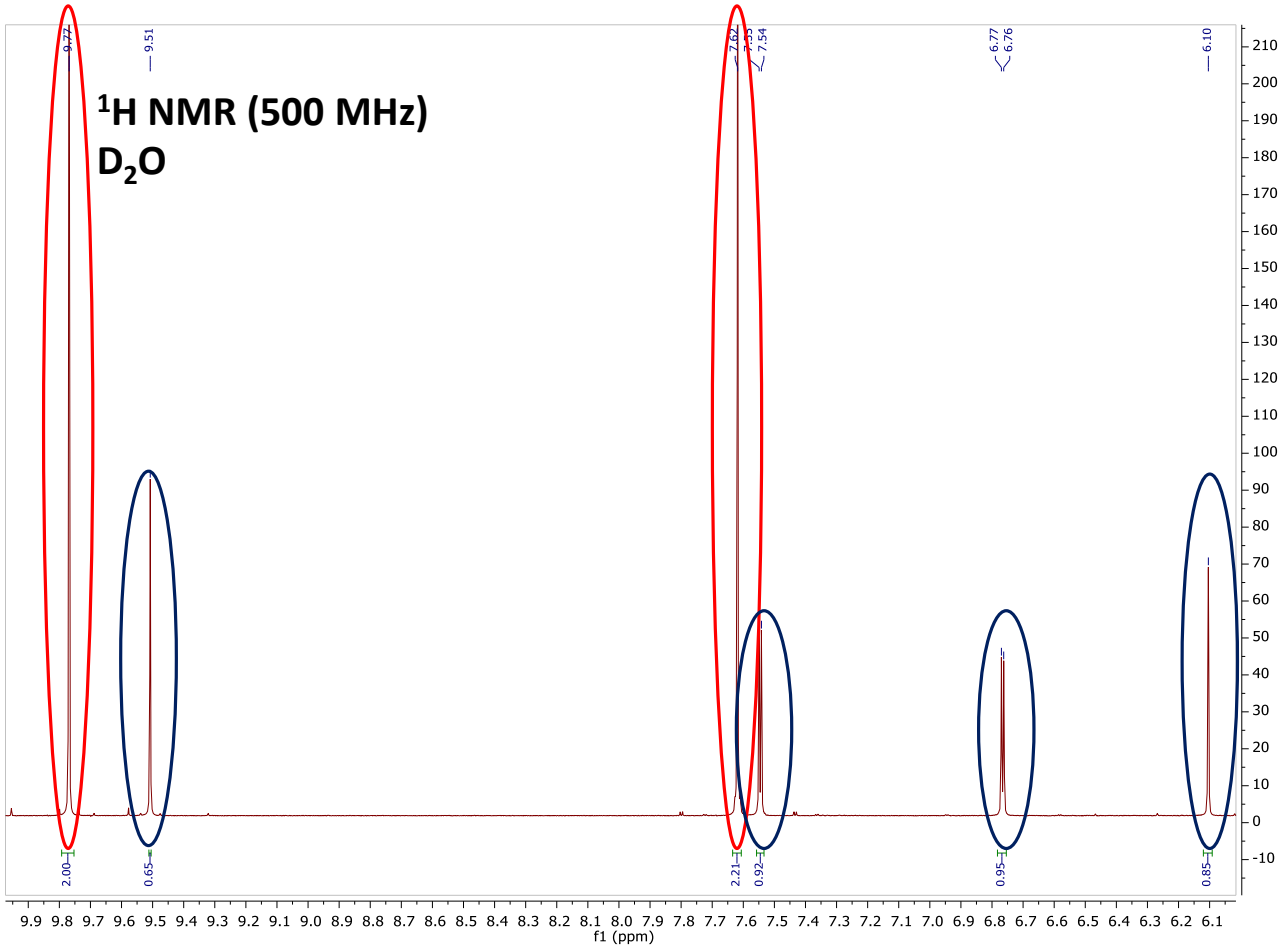
Spettri acquisiti in:
- 10% KPi (1 M pH 7)
- 90% D_2O

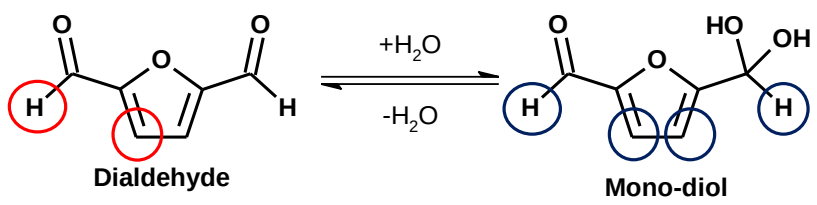
Concentrazione finale tampone: 0.1 M



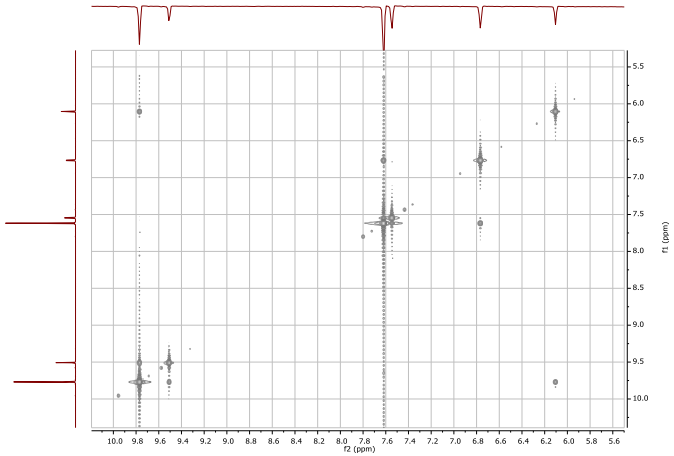


DFF in ambiente acquoso – ^{1}H NMR

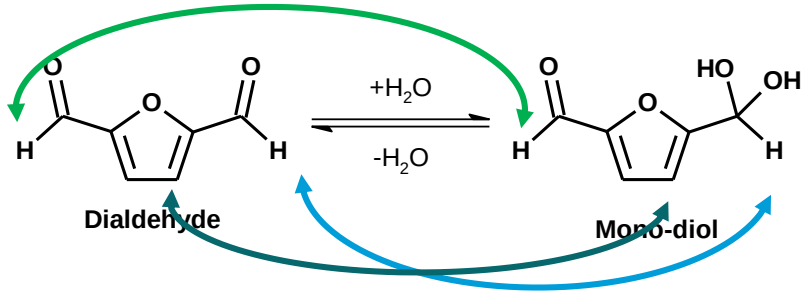




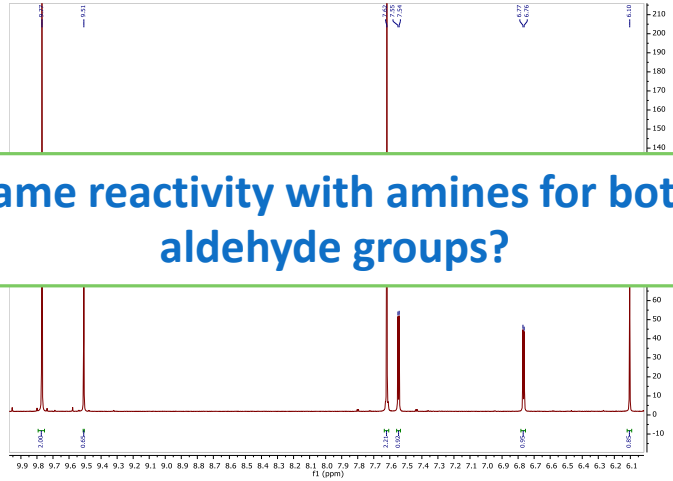
Ratio DFF:Diol
Approx. 1:1



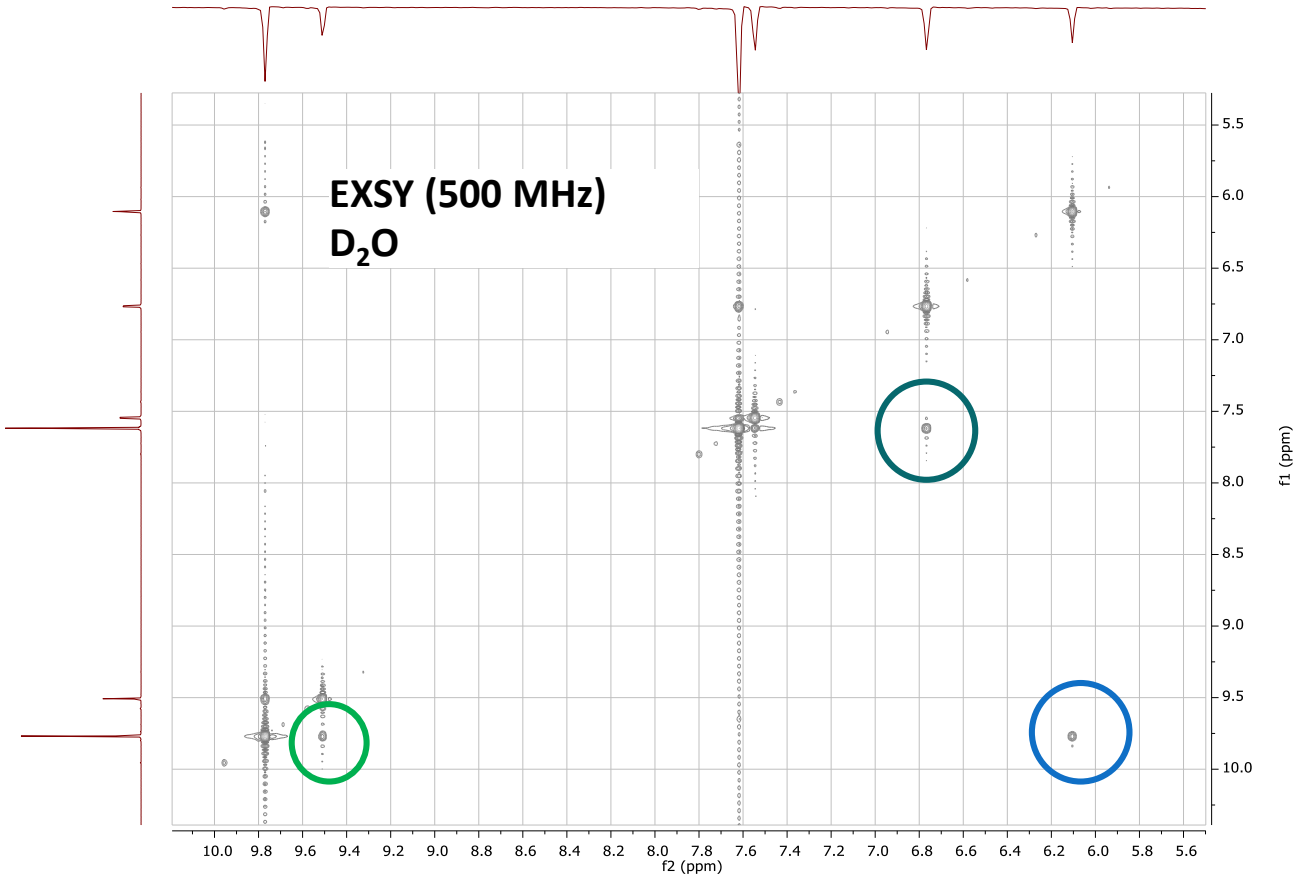
DFF in ambiente acquoso – EXSY



Exchange peaks: equilibrium!

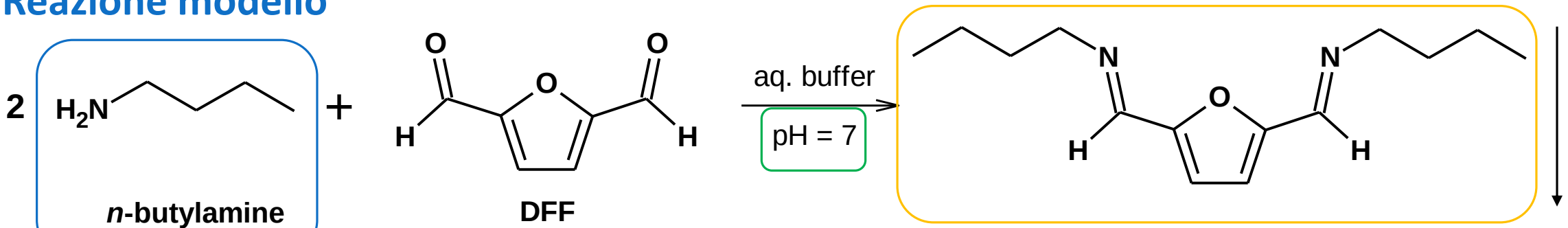


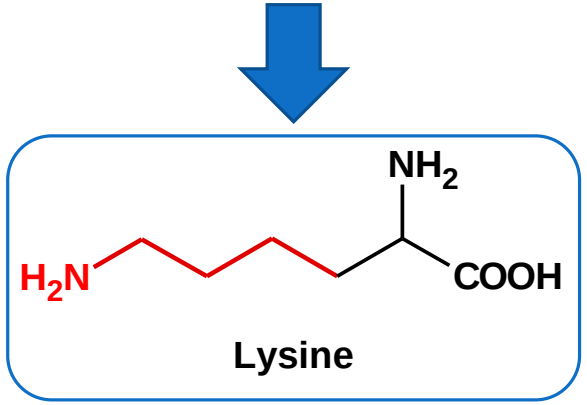
Same reactivity with amines for both aldehyde groups?



DFF – Reattività con gruppi amminici

Reazione modello

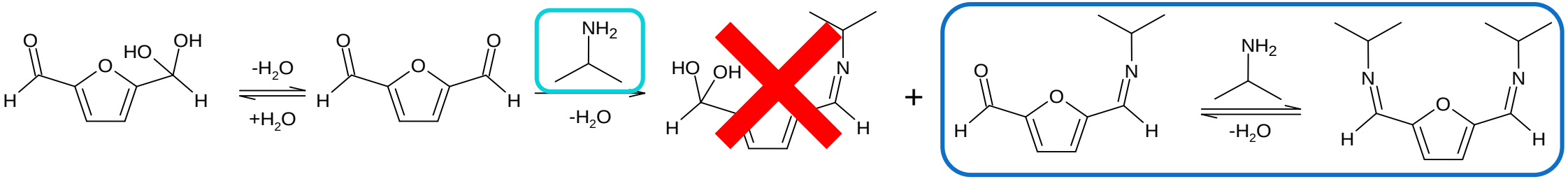




- *n*-dibutilammina rappresenta la catena laterale della lisina
- Il tampone è lo stesso utilizzato per la reazione di immobilizzazione
- La **di-immina** è l'unico prodotto di reazione (TLC)
- La **di-immina** è stata isolata e caratterizzata
  - ^{1}H NMR
  - ^{13}C NMR

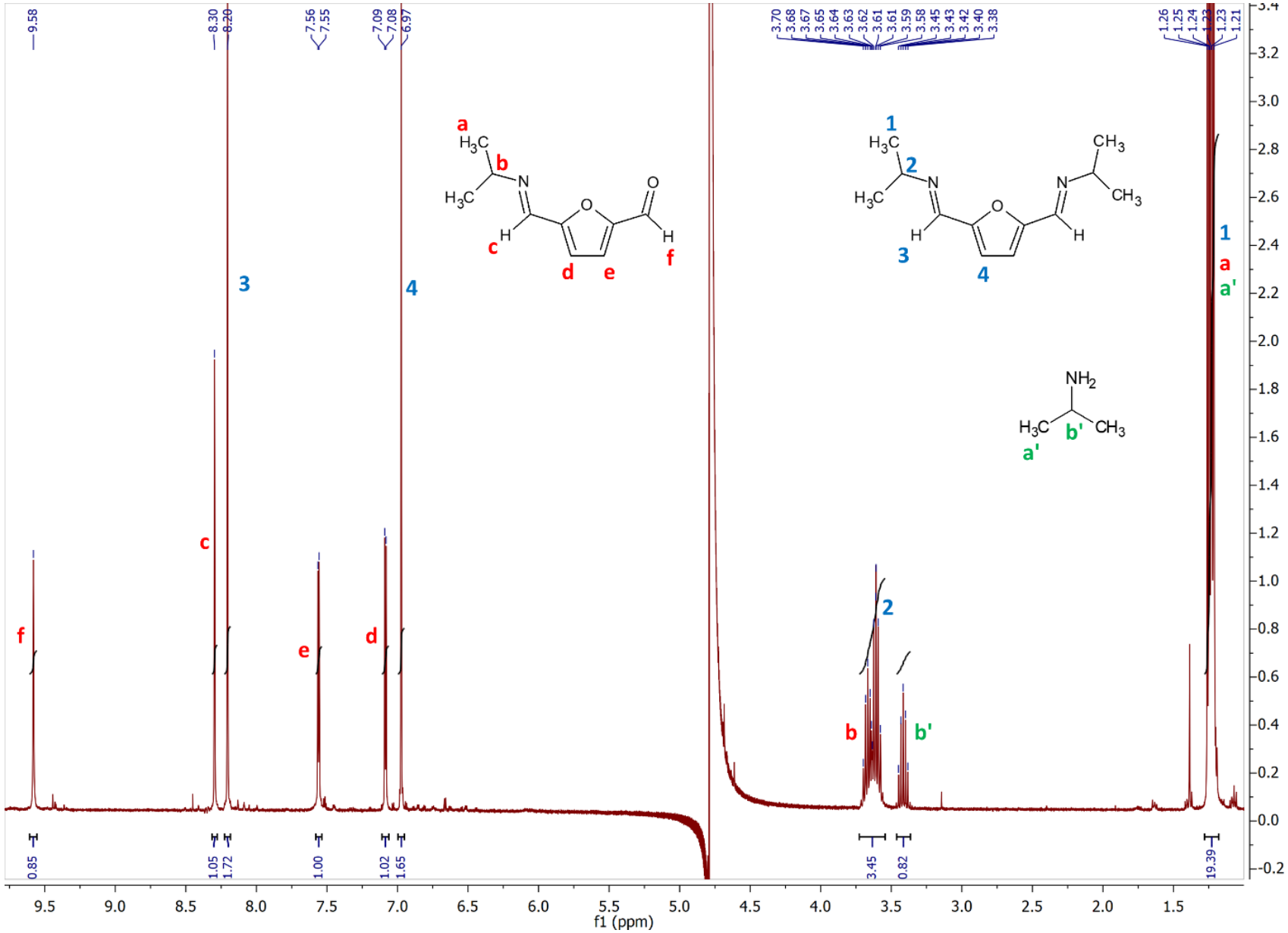
DFF – Reattività con gruppi amminici

Reazione con isopropilammina



- Isopropilammina dà un prodotto di reazione solubile
- Il tampone è lo stesso utilizzato per la reazione di immobilizzazione (KPi, 0.1 M, pH 7)
- **Non** si osserva formazione di mono-immina idratata
- Non si osserva presenza di DFF non reagito
- Miscela di reazione: mono-immina e di-immina (solubili in ambiente acquoso)
  - ^{1}H NMR

Reazione con isopropilammina



Spettro acquisito in:

- 10% KPi (1 M pH 7)
- 90% D_2O

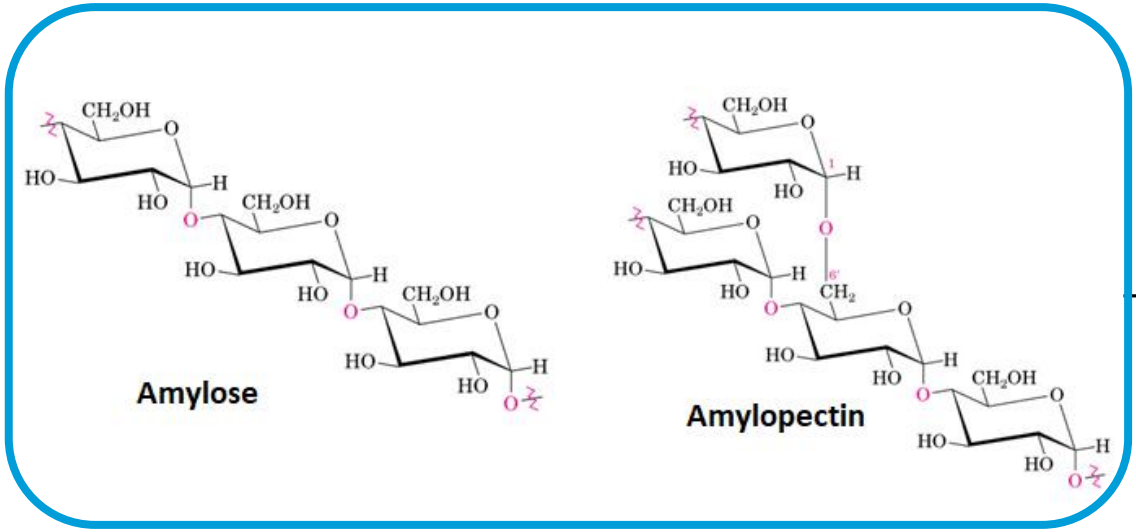
Concentrazione finale tampone: 0.1 M

400 MHz

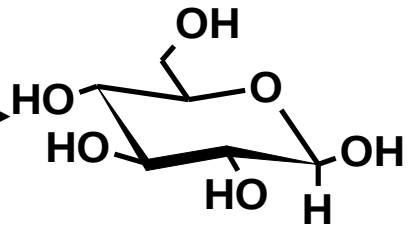
Immobilizzazione di glucoamilasi con DFF e glutaraldeide

- **Glucoamilasi**: idrolisi dell'amido a glucosio
- **Esoamilasi**: idrolisi a partire dall'estremità non riducente della catena di amido
- Utilizzata industrialmente nella saccarificazione dell'amido per produrre glucosio, etanolo (bioraffinerie)
- Enzima altamente **glicosilato** ed **idrofilico**

Amido



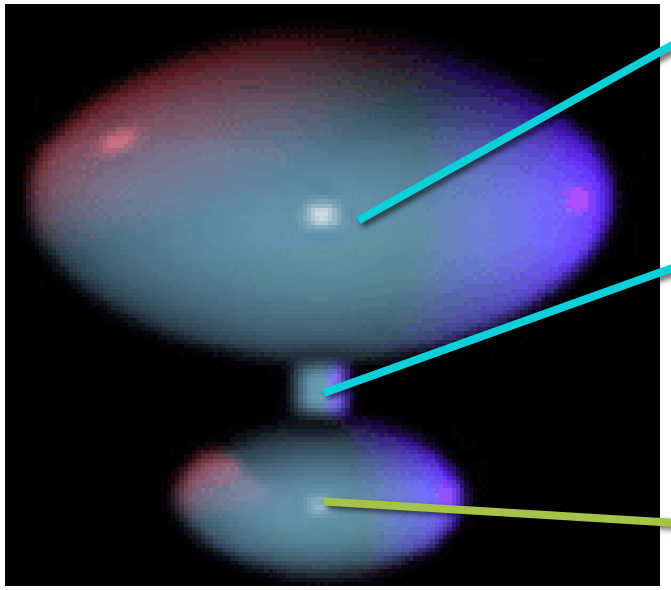
glucoamilasi



β-D-glucopiranosio

Struttura – Glucoamilasi da *A. niger*

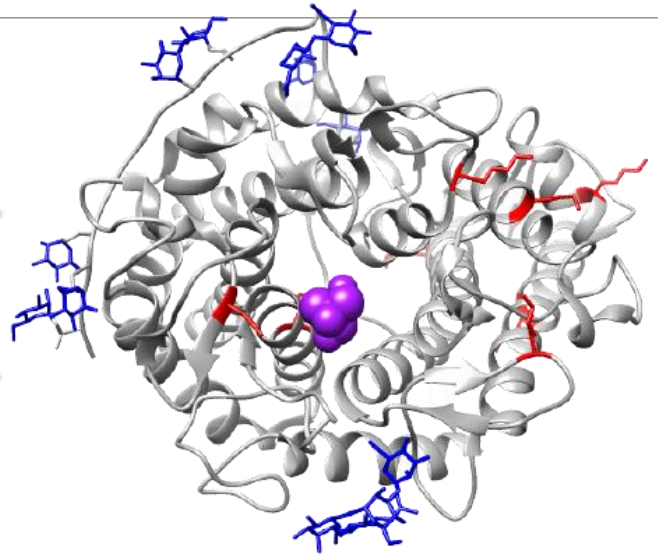
Struttura schematica della glucoamilasi



Dominio catalitico

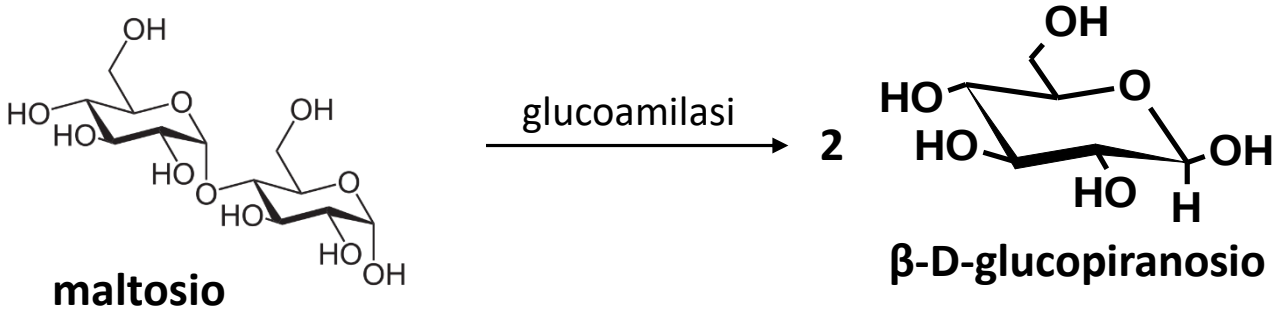
Linker

Starch-binding domain



PDB IDs: 3EQA, 5GHL

Test di attività per la glucoamilasi



maltosio

β-D-glucopiranosio

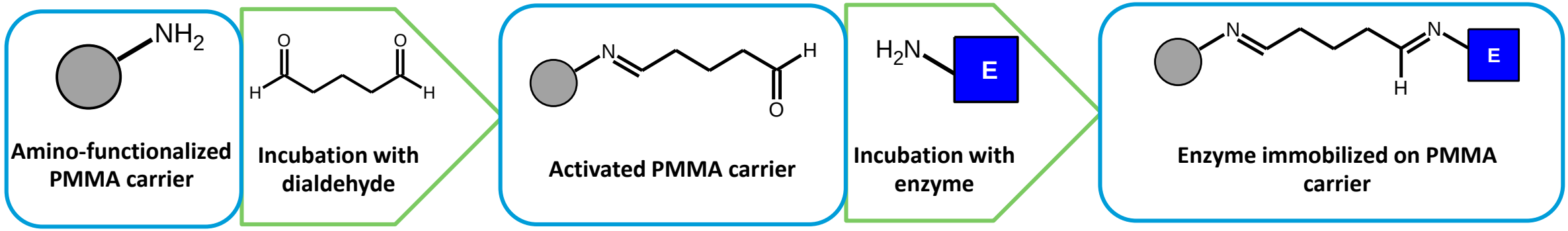
- Misura della concentrazione di glucosio nel surnatante durante la reazione
- **1 unità enzimatica** (glucoamilasi) ⇒ quantità di enzima che idrolizza **1 µmol** di maltosio nelle seguenti condizioni:
- 25% maltosio in tampone citrato 10 mM, pH 4.5, a temperature ambiente (20°C)

I legami imminici dovrebbero idrolizzarsi a pH acido!!!

Immobilizzazione di glucoamilasi con DFF e glutaraldeide – *Proof of concept*

Step 1 – Carrier activation

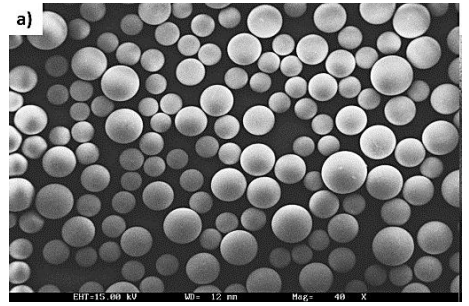
Step 2 – Enzyme binding



Attivazione: 200 µmol dialdeide/g_{wet} carrier

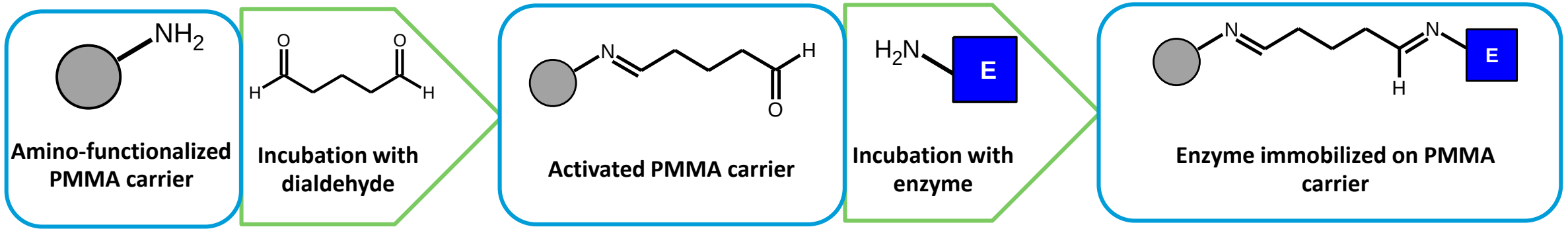
Loading: 120 U/g_{wet} carrier

- Carrier: RelyZyme HA403/M, particle size 200-400 µm
- Poly(methyl methacrylate) carrier
- Hexamethyleneamino functionalized
- Amine groups: min. 600 µmol/g_{wet}



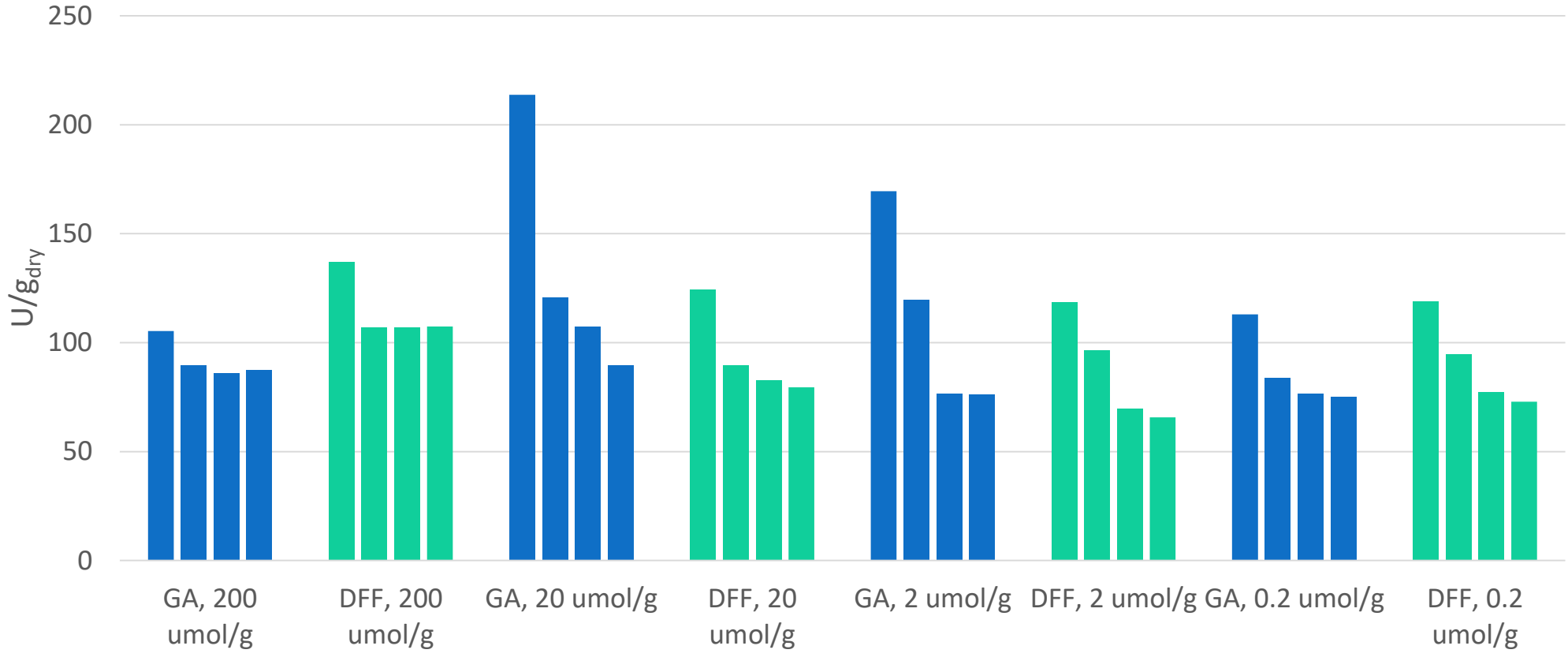
Immobilizzazione di glucoamilasi con DFF e glutaraldeide

Step 1 – Carrier activation **Step 2 – Enzyme binding**



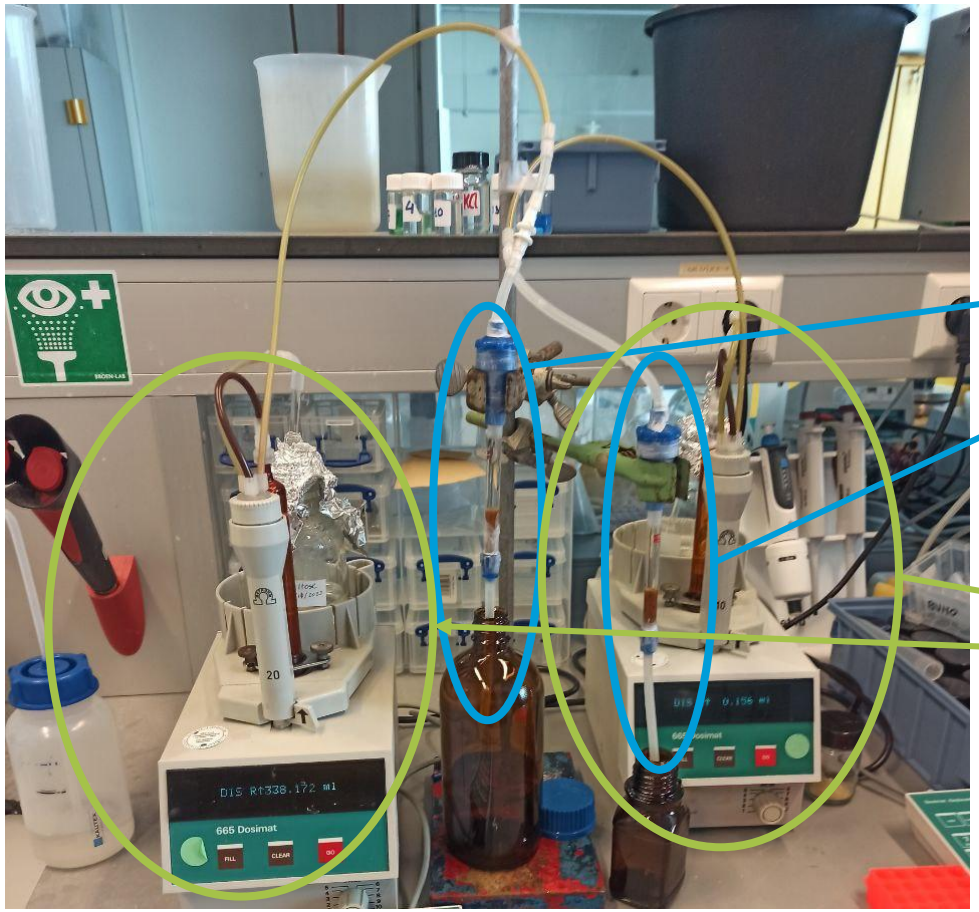
- Diverse quantità di dialdeide per lo step di attivazione
  - 20 µmol/$g_{carrier,\ wet}$
  - 2 µmol/$g_{carrier,\ wet}$
  - 0.2 µmol/$g_{carrier,\ wet}$
- **Loading enzimatico: 120 U/g_{wet}, 343 U/g_{dry}**

Immobilizzazione di glucoamilasi con DFF e glutaraldeide – Attività recuperata



Attività idrolitica mantenuta per almeno 3 cicli catalitici (*batch*)

Attività idrolitica in *continuous flow* – Setup sperimentale

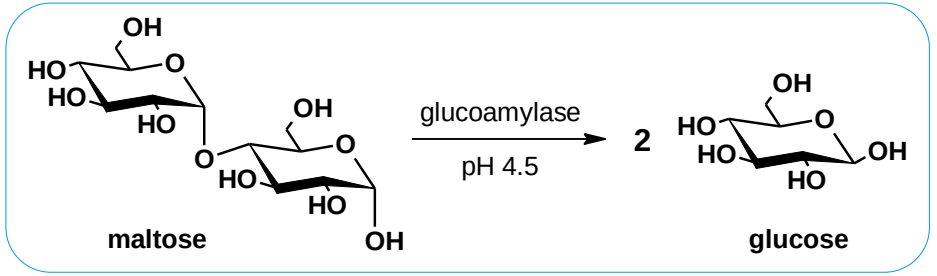


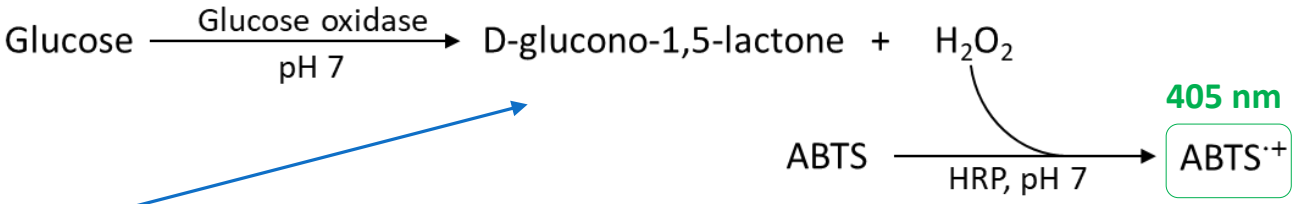
Colonne

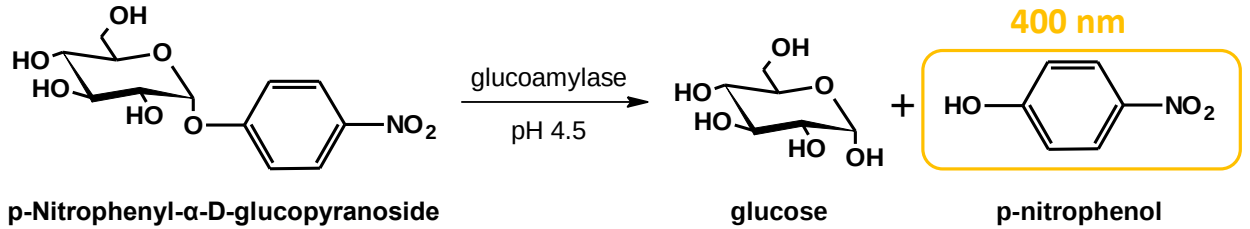
Pompe

Attività idrolitica in *continuous flow* – Metodologia

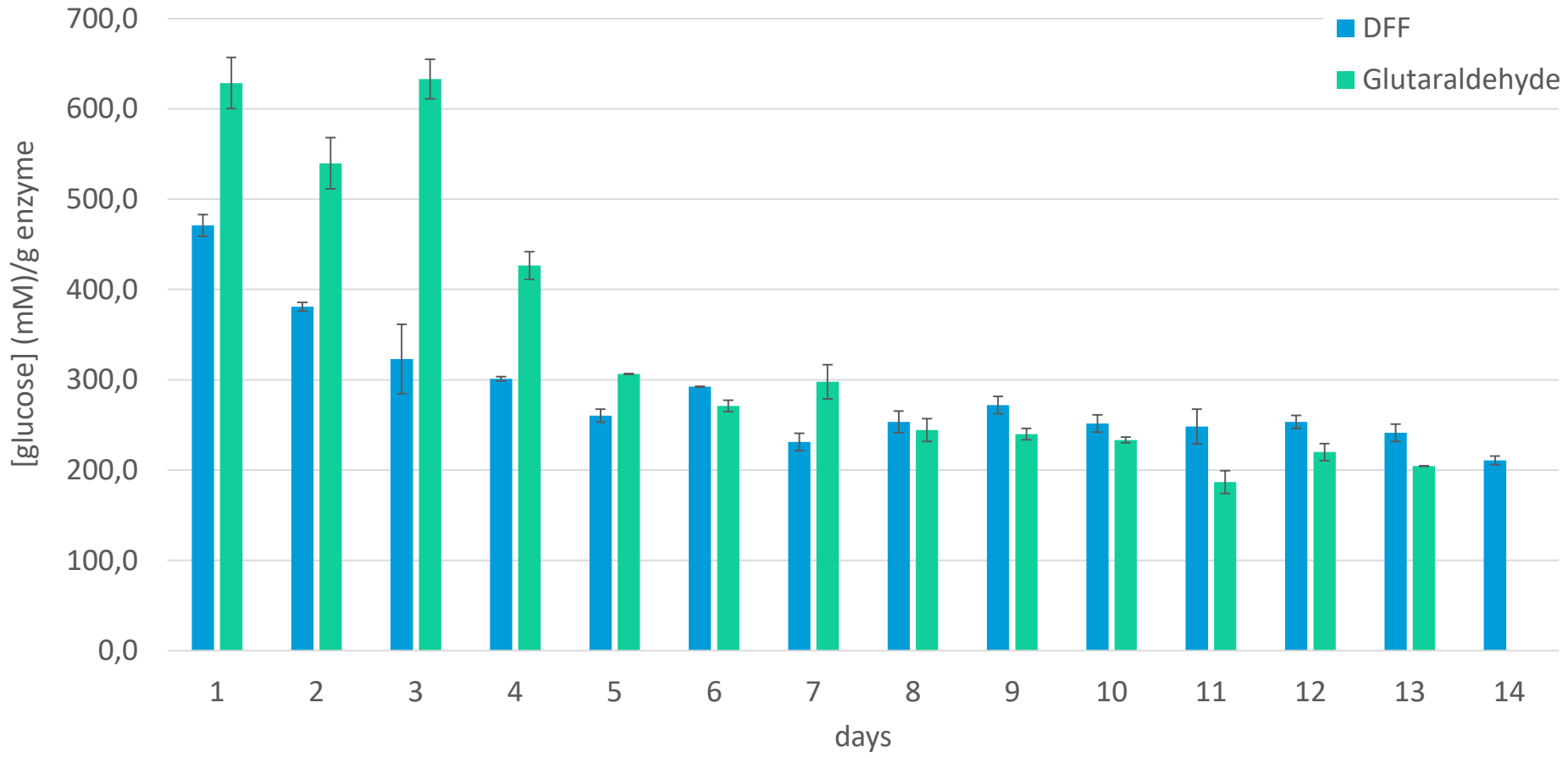
- Colonna da 10 mL
- 150 mg di glucoamylasi immobilizzata su carrier metacrilico
  - Crosslinker: DFF oppure glutaraldeide, 0.2 µmol/$g_{carrier}$
- **Soluzione di substrato**: 25% maltosio in tampone citrato 10 mM (pH 4.5)
  - Flusso: 0.15 mL/min
- Reazione monitorata per **13 giorni**
- Campioni di effluente raccolti ogni 24 ore
- **<u>Analisi su effluente</u>:**
  - **Concentrazione di glucosio**
  - **Leaching enzimatico**





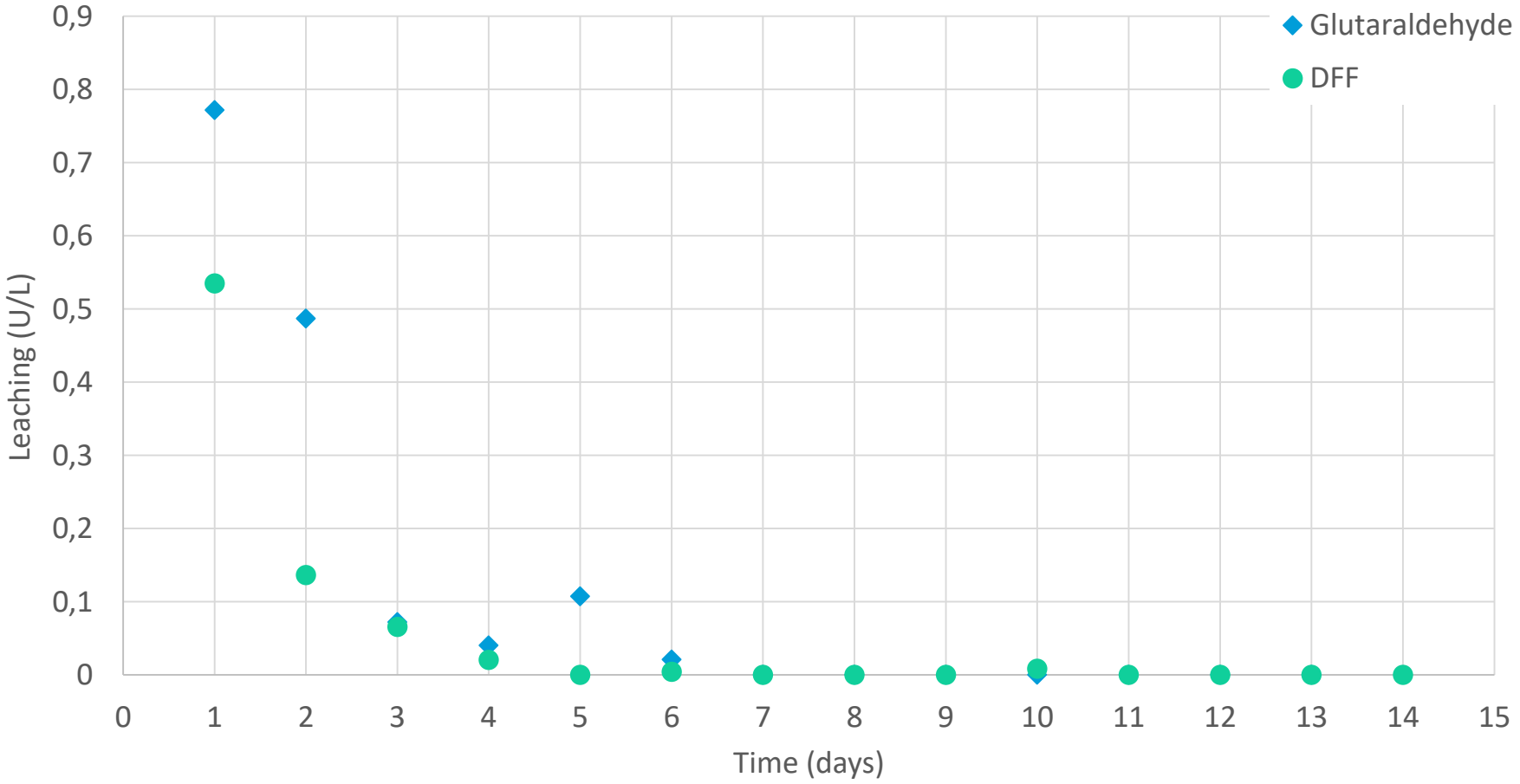


Attività idrolitica in *continuous flow*



C. Danielli, L. van Langen, D. Boes, F. Asaro, S. Anselmi, F. Provenza, M. Renzi, L. Gardossi, *RSC Adv.*, 2022, **12**, 35676

Attività idrolitica in *continuous flow* – Leaching enzimatico



RSC Advances

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Check for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2022, **12**, 35676

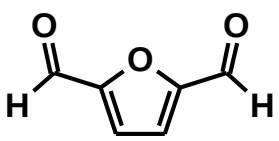
2,5-Furandicarboxaldehyde as a bio-based crosslinking agent replacing glutaraldehyde for covalent enzyme immobilization†

Chiara Danielli,[ab] Luuk van Langen,[b] Deborah Boes,[bc] Fioretta Asaro,[a] Serena Anselmi,[d] Francesca Provenza,[de] Monia Renzi[e] and Lucia Gardossi *[a]

Progetto di tesi

Sustainable immobilized biocatalysts for industrial processes

Nuovo crosslinkante bio-based



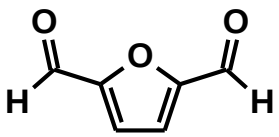
2,5-diformylfuran

- Caratterizzazione
- Immobilizzazione di enzimi su carrier tradizionali (PMMA)
- Confronto sistematico con crosslinkante tradizionale (glutaraldeide)

Progetto di tesi

Sustainable immobilized biocatalysts for industrial processes

Nuovo crosslinkante bio-based



2,5-diformylfuran

- Caratterizzazione
- Immobilizzazione di enzimi su carrier tradizionali (PMMA)
- Confronto sistematico con crosslinkante tradizionale (glutaraldeide)

Supporto bio-based per enzimi

Lolla di riso

- Caratterizzazione
- Funzionalizzazione
- Immobilizzazione di enzimi
- Applicazione in condizioni rilevanti dal punto di vista industriale

Progetto di tesi

Sustainable immobilized biocatalysts for industrial processes

Supporto bio-based per enzimi

Lolla di riso

- Caratterizzazione
- Funzionalizzazione
- Immobilizzazione di enzimi
- Applicazione in condizioni rilevanti dal punto di vista industriale

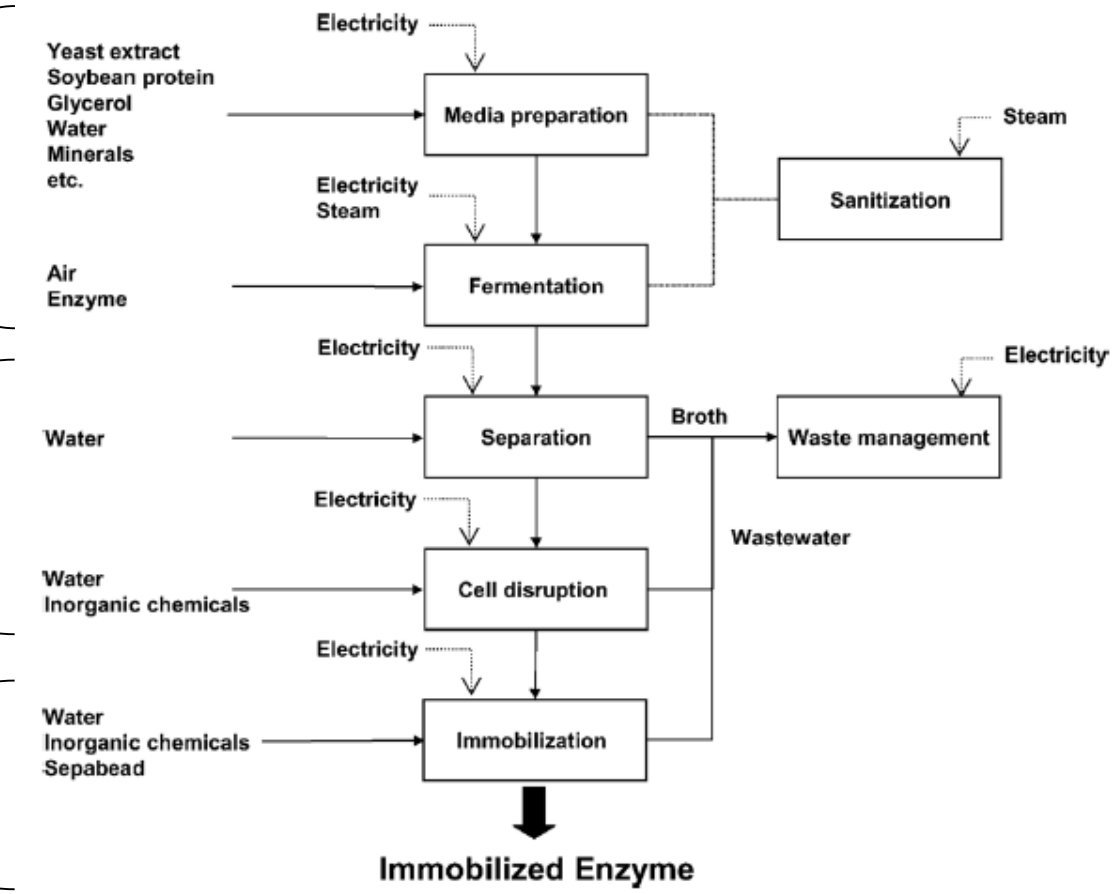
Utilizzo di supporti derivati da biomassa

Sostenibilità degli enzimi immobilizzati: Life Cycle Analysis (LCA)

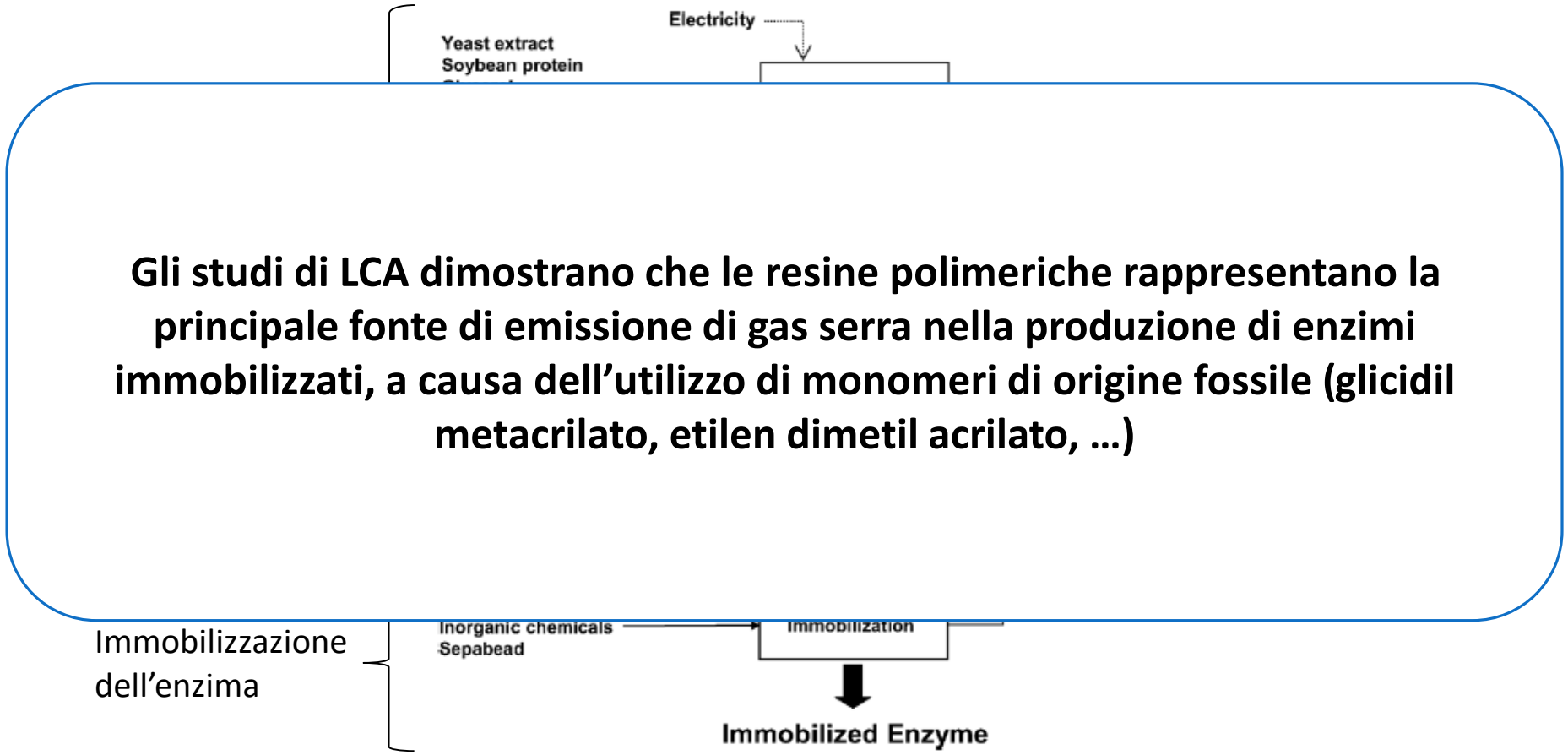
Crescita e fermentazione del microrganismo

Separazione dell'enzima

Immobilizzazione dell'enzima



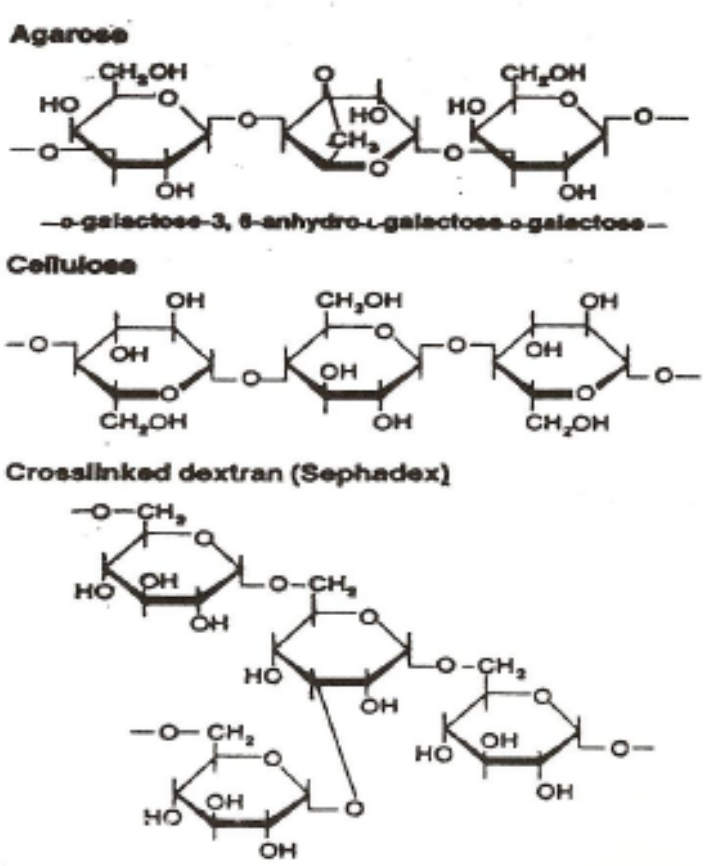
Sostenibilità degli enzimi immobilizzati: Life Cycle Analysis (LCA)



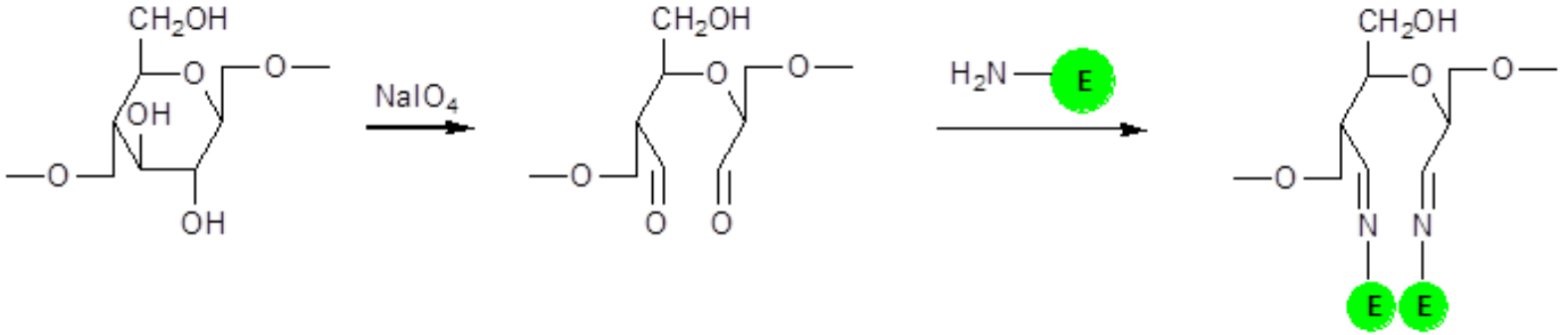
Gli studi di LCA dimostrano che le resine polimeriche rappresentano la principale fonte di emissione di gas serra nella produzione di enzimi immobilizzati, a causa dell'utilizzo di monomeri di origine fossile (glicidil metacrilato, etilen dimetil acrilato, …)

Biopolimeri come supporti enzimatici?

- I **biopolimeri** possono rappresentare un'alternativa alle resine di origine fossile sia da un punto di vista ambientale che economico.
- Alcuni **carboidrati** insolubili in acqua come **cellulosa**, amido, destrano, **agarosio** e **chitosano**, oltre che proteine come albumina e gelatina, sono stati usati come supporti per l'immobilizzazione di enzimi.
- I **polisaccaridi** sono particolarmente interessanti, in quanto:
  - Non presentano **rischi biologici**, a differenza delle proteine isolate da fonti animali
  - Sono altamente idrofilici (microambiente favorevole per l'attività di numerosi enzimi)
- I gruppi idrossilici –OH dei polisaccaridi possono essere sfruttati per l'immobilizzazione covalente di proteine dopo uno step di **attivazione**.



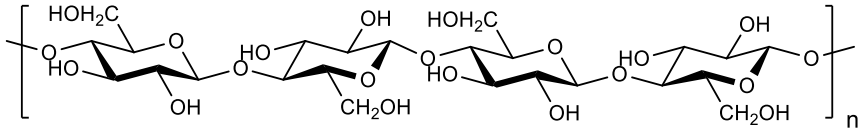
Attivazione della cellulosa per l'immobilizzazione covalente



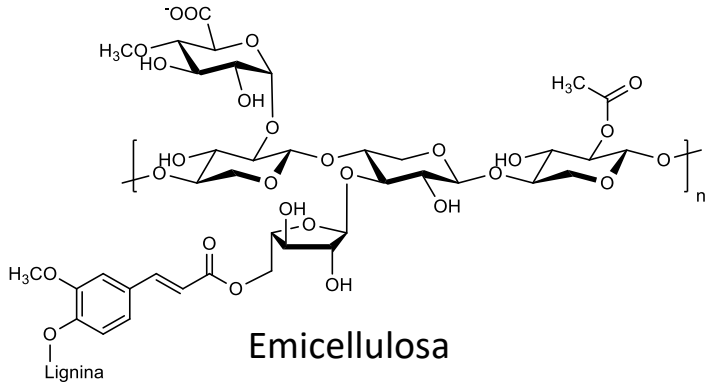
- La **cellulosa** (polimero del glucosio) può essere attivata tramite **ossidazione** dei gruppi ossidrilici dei monomeri di glucosio.
- L'ossidazione chimica ($NaIO_4$) porta alla rottura del legame C2-C3 del glucosio e alla formazione di **due gruppi aldeidici** per ogni unità di glucosio
- I gruppi aldeidici possono reagire con gruppi amminici dell'enzima per formare **legami covalenti**.
- La capacità di binding della cellulosa è inferiore rispetto ad altri polisaccaridi come l'agarosio, ma d'altra parte è ampiamente disponibile a costi competitivi.

Biomasse lignocellulosiche

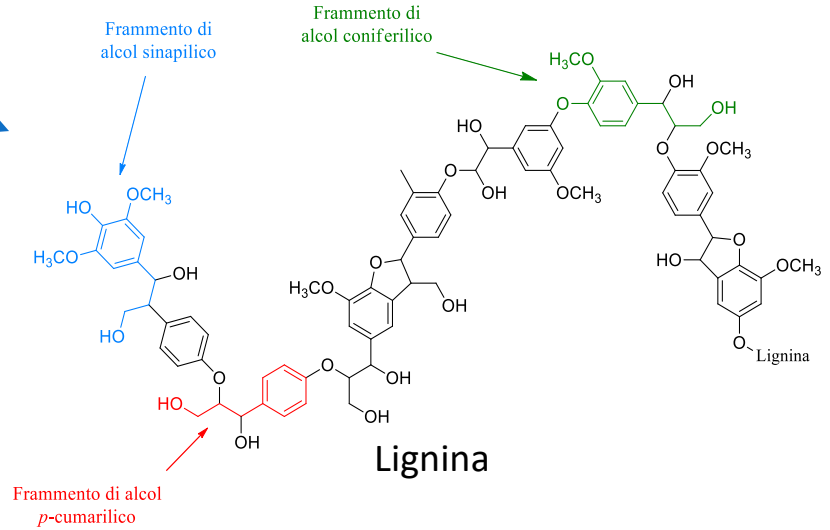
Biomassa lignocellulosica



Cellulosa



Emicellulosa



Lignina

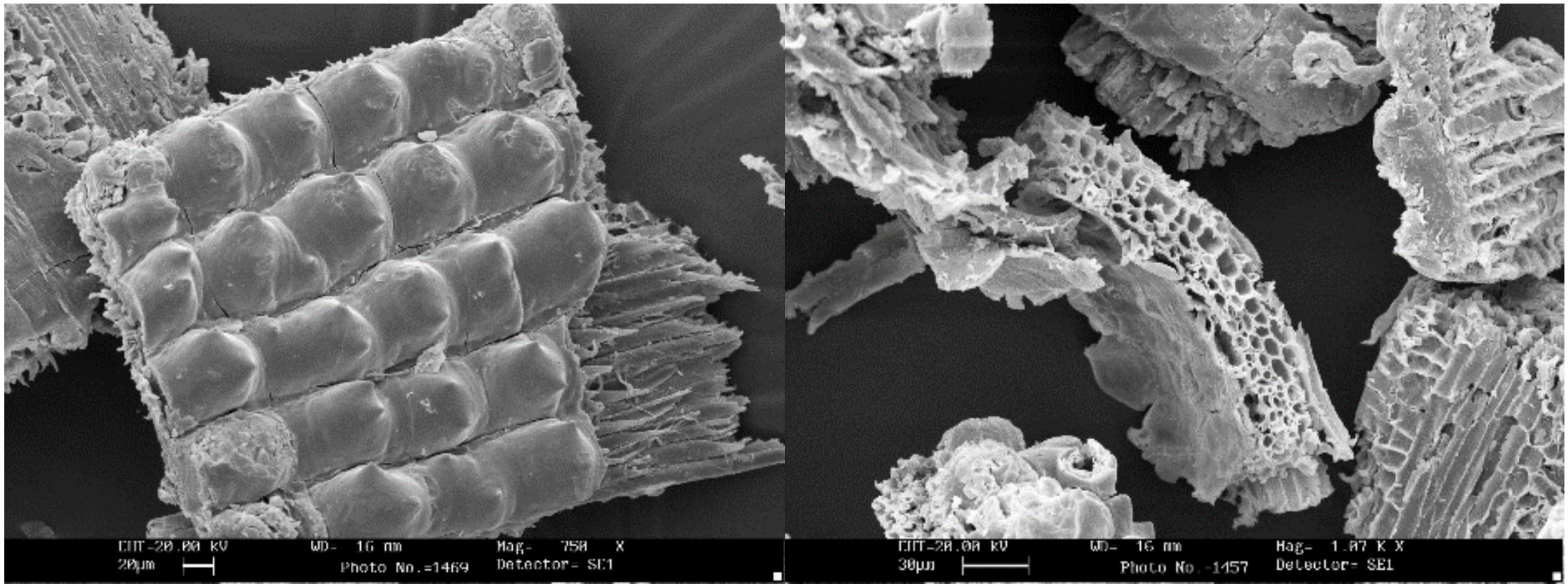
La lolla di riso: un materiale lignocellulosico rinnovabile

Componente	%wt.
Silica	20-25
Cellulosa	46.5
Lignina	31.9
Emicellulosa	22.1

- Cuticola esterna del seme di riso
- Produzione 120 Mt/anno
  - Utilizzate solo 20 Mt/anno
  - Costo massimo: 90 €/ton
  - Produzione continua
- Possibili applicazioni:
  - Materiali adsorbenti
  - Additivi per materiali da costruzione
  - **Supporto per immobilizzazione di enzimi**
  - Materiali biocompostabili

L. Corici, V. Ferrario, A. Pellis, C. Ebert, S. Lotteria, S. Cantone, D. Voinovich, L. Gardossi, *RSC Advances*, 2016, **6**, 63256-63270

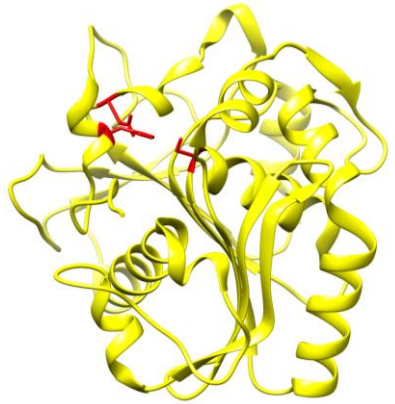
La lolla di riso: un materiale lignocellulosico rinnovabile



Selezione enzimi da immobilizzare su lolla di riso

1. **Glucoamilasi**
   - Da *Aspergillus niger*
   - Ampie applicazioni industriali nell'idrolisi dell'amido
2. **Lipasi**
   - Applicazioni industriali per l'interesterificazione di oli e grassi
   - Due lipasi selezionate:
     a) Lipasi da *Thermomyces lanuginosus* (TLL)
        - Lipasi «classica», con *lid*

     b) Lipase B from *Candida antarctica* (CaLB)
        - Lipasi atipica, senza *lid*
        - Disponibile commercialmente come Novozym 435

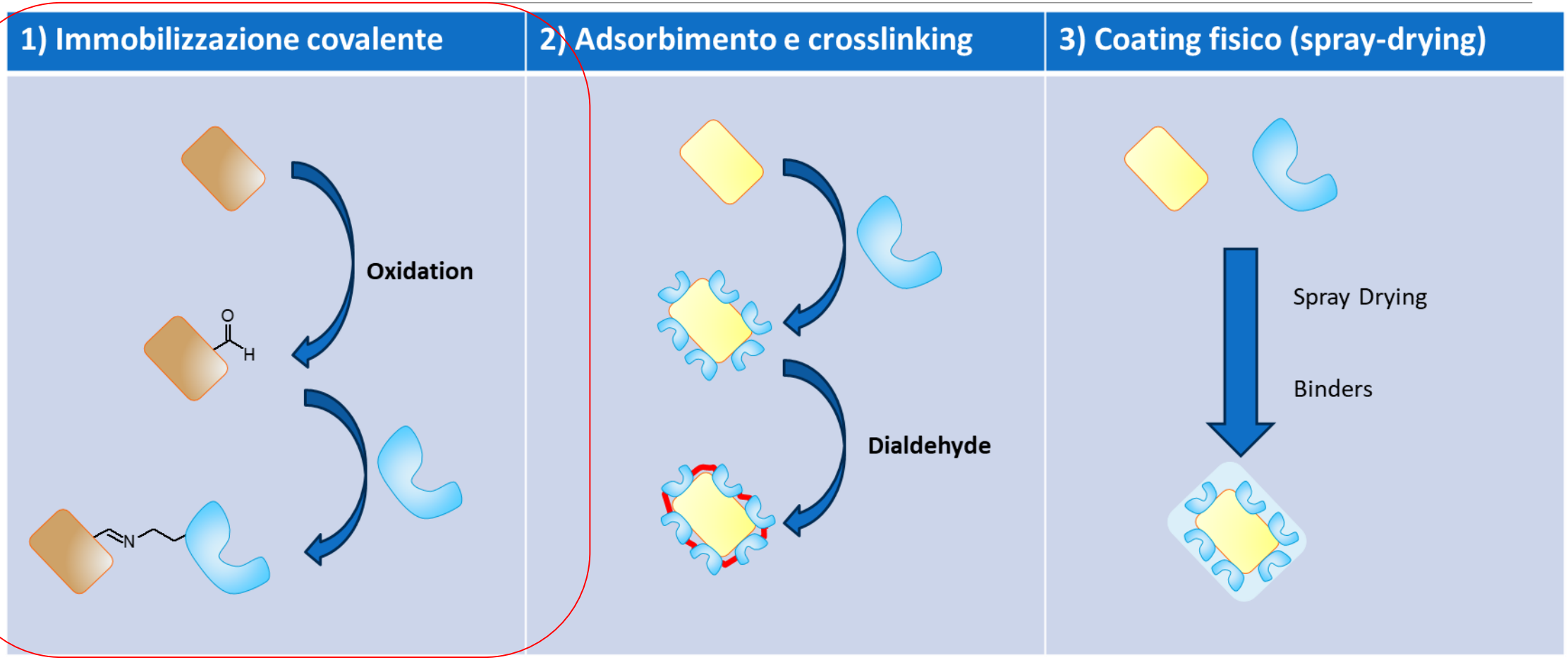


TLL

CaLB

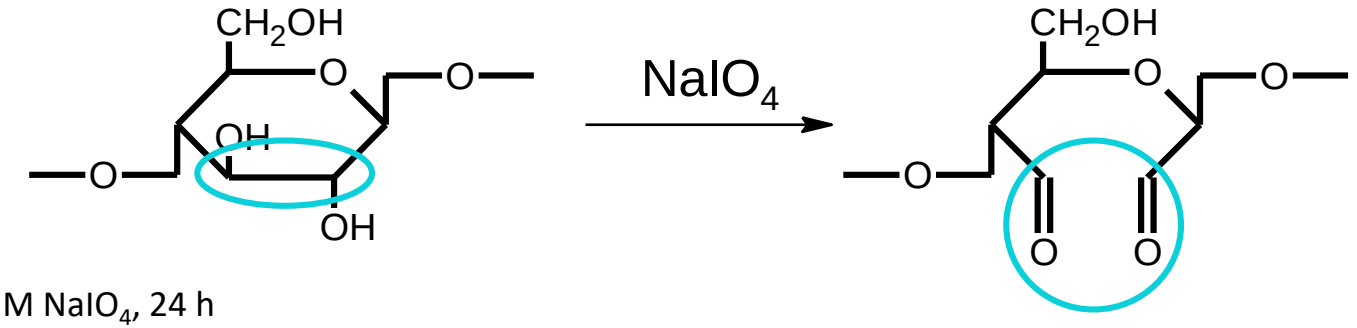
PDB IDs: 1EIN (TLL), 1TCA (CaLB), V. Ferrario, C. Ebert, L. Knapic, D. Fattor, A. Basso, P. Spizzo, L. Gardossi, *Adv. Synth. Catal.* 2011, **13**, 2466-2480

Immobilizzazione su lolla di riso – Stato dell'arte



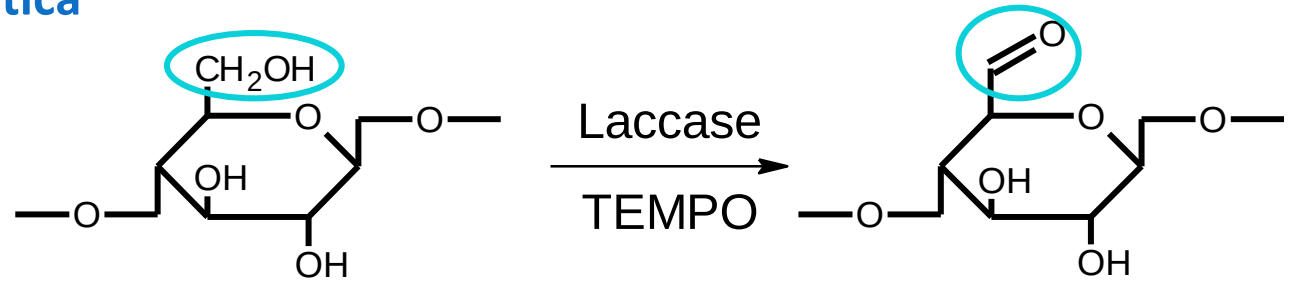
Funzionalizzazione della lolla di riso: ossidazione della cellulosa

Ossidazione chimica

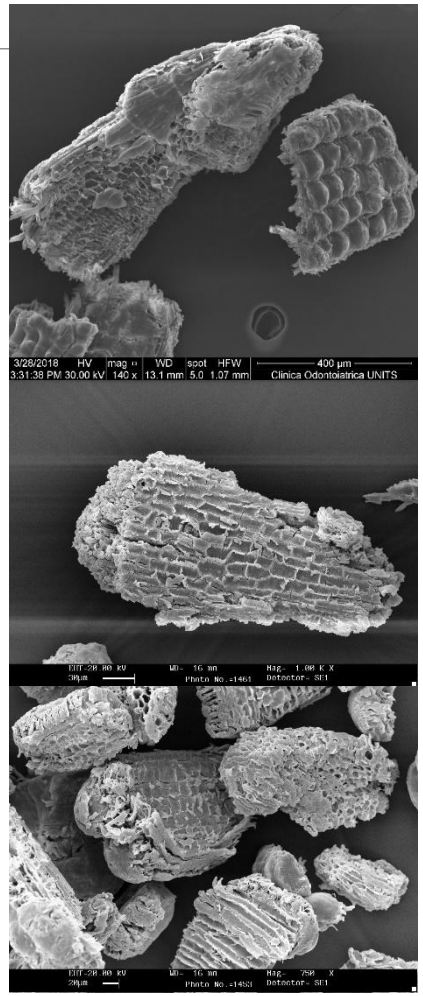


Ossidazione chimica: 0.2 M $NaIO_4$, 24 h

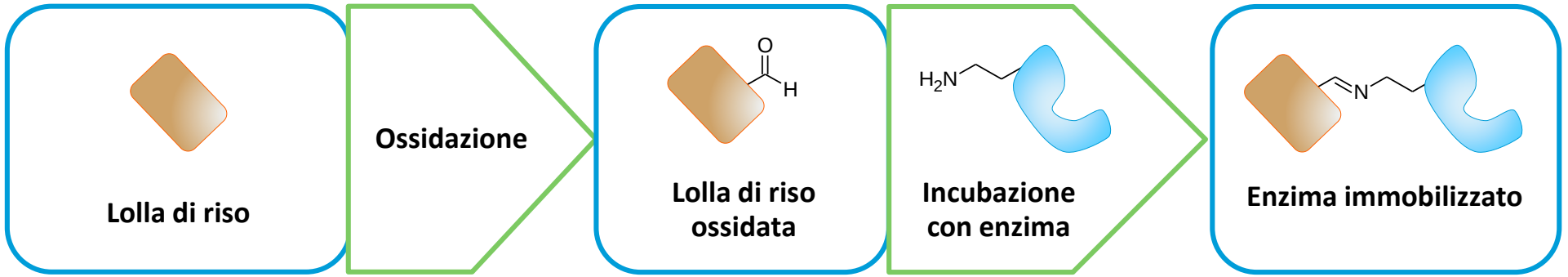
Ossidazione enzimatica

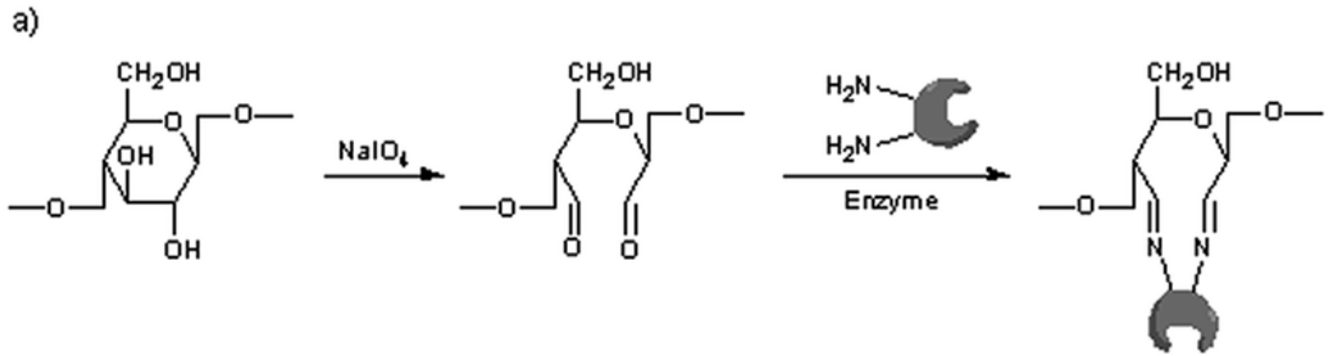


Ossidazione enzimatica: Laccasi C (8 U/mL) + TEMPO (10 mM) in tampone citrato (0.1 M, pH 5)



Immobilizzazione di enzimi su lolla di riso ossidata

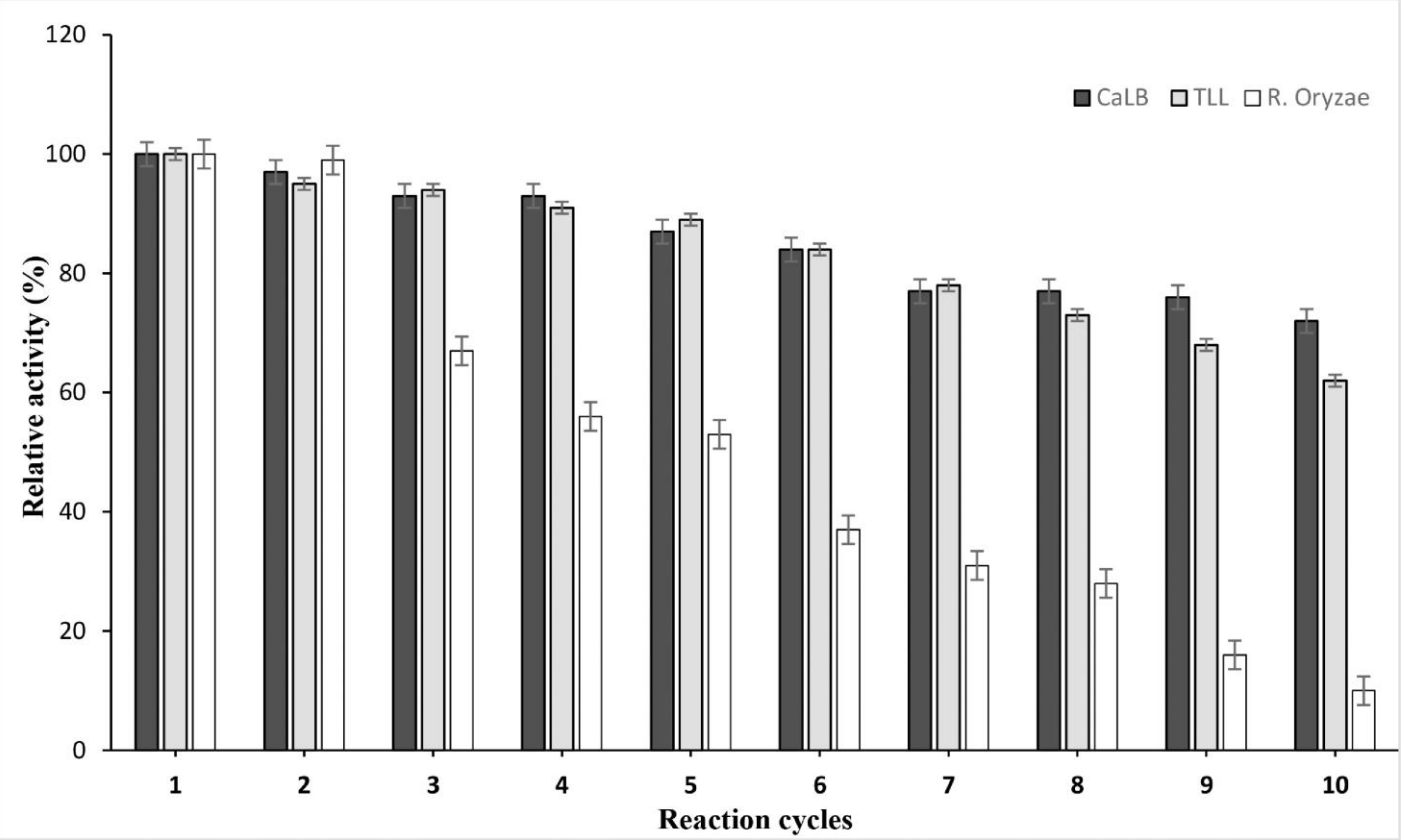




Immobilizzazione di enzimi su lolla di riso ossidata – *Letteratura*

Lipase	Oxidation method	Other functionalization	Protein loaded (%)	Hydrolytic activity (Ug^{-1}_{dry})	Immobilization yield (%)
CALB	LMS	no	65	590±2	5.9
TLL	LMS	no	72	974± 65	9.74
ROL	LMS	no	53	328± 42	3.28
CALB	$NaIO_4$	no	33	290±45	2.90
TLL	$NaIO_4$	no	56	643 ± 67	6.43
ROL	$NaIO_4$	no	32	171 ± 14	1.71
CALB	LMS	GA	55	155±5	1.55
CALB	$NaIO_4$	GA	65	<50	<0,5
CaLB	LMS	HMDA+GA	17	56 ± 25	0.56
CaLB	$NaIO_4$	HMDA+GA	72	316	3.16
CaLB	n.a.	Epoxy (on methacrylic resin)	95	709	7.09

Immobilizzazione di lipasi su lolla di riso ossidata enzimaticamente - *Letteratura*



M. Cespugli et al., *Catalysts* **2018**, *8*, 471

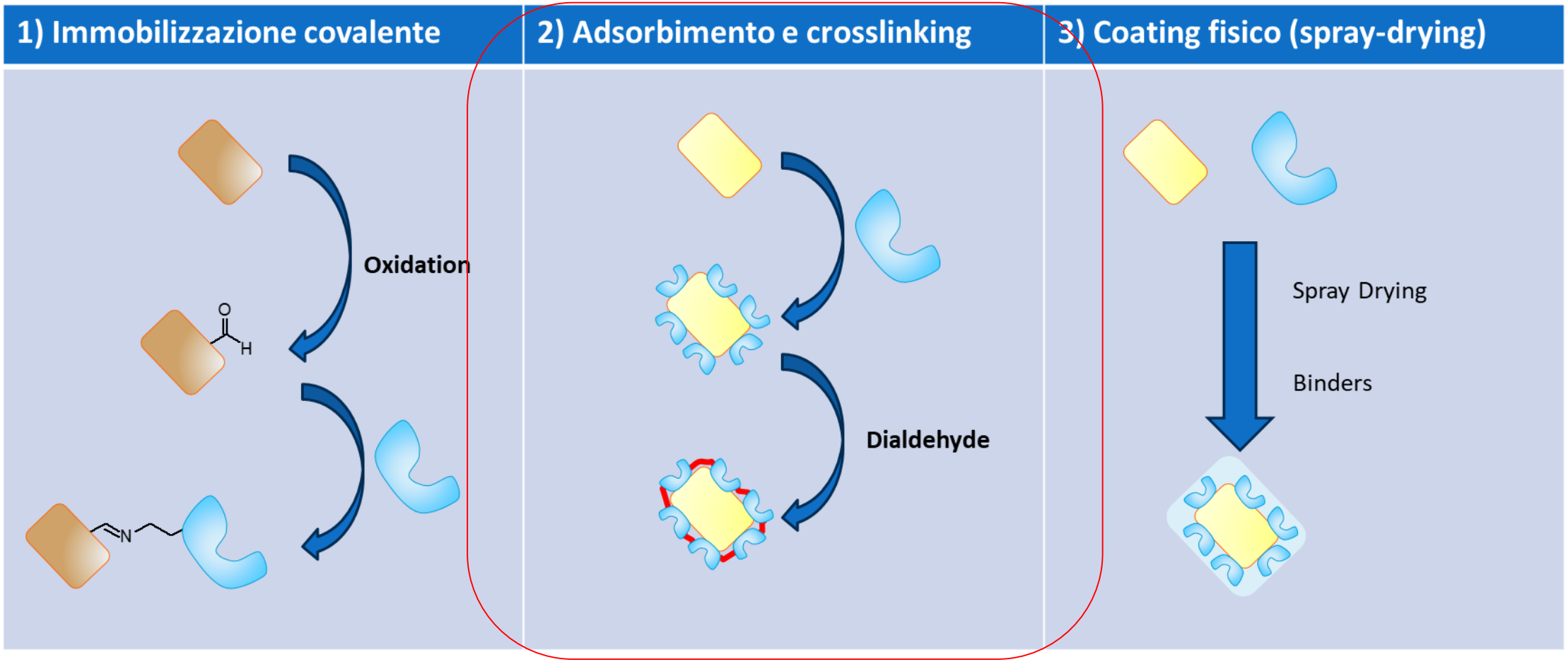
Immobilizzazione di glucoamilasi su lolla di riso ossidata

	Ossidazione	Condizioni di immobilizzazione	Attività recuperata (U/g)	Resa (%)
1	$NaIO_4$	KPi, 25 mM, pH 7, 24 h	0	-
3	LMS	KPi, 25 mM, pH 7, 24 h	0	-
5	$NaIO_4$	KPi, 0,1 M, pH 7, 24 h	0,13	0,04
9	$NaIO_4$	KPi, 0,5 M, pH 8, 72 h	0	-

- Loading enzimatico esp. 1, 3, 5: 365 U/g_{dry}
- Loading enzimatico esp. 9: 632 U/g_{dry}

Non esiste un metodo di immobilizzazione che funzioni in modo generale per tutti gli enzimi

Immobilizzazione su lolla di riso – Stato dell'arte



Immobilizzazione di lipasi su lolla di riso tramite adsorbimento e crosslinking

- Enzimi utilizzati:
  - Glucoamilasi
  - CaLB
  - TLL
- Testate diverse condizioni di immobilizzazione basandosi su letteratura

Immobilizzazione di glucoamilasi su lolla di riso tramite adsorbimento e crosslinking

	Condizioni di immobilizzazione	Attività recuperata (U/g)
1	KPi, 0,5 M, pH 8	0
2	KPi, 0,1 M, pH 7	0
3	KPi, 0,5 M, pH 8, with 2 mg/mL PEG-3000	0
4	KPi, 0,1 M, pH 7, with 2 mg/mL PEG-3000	0

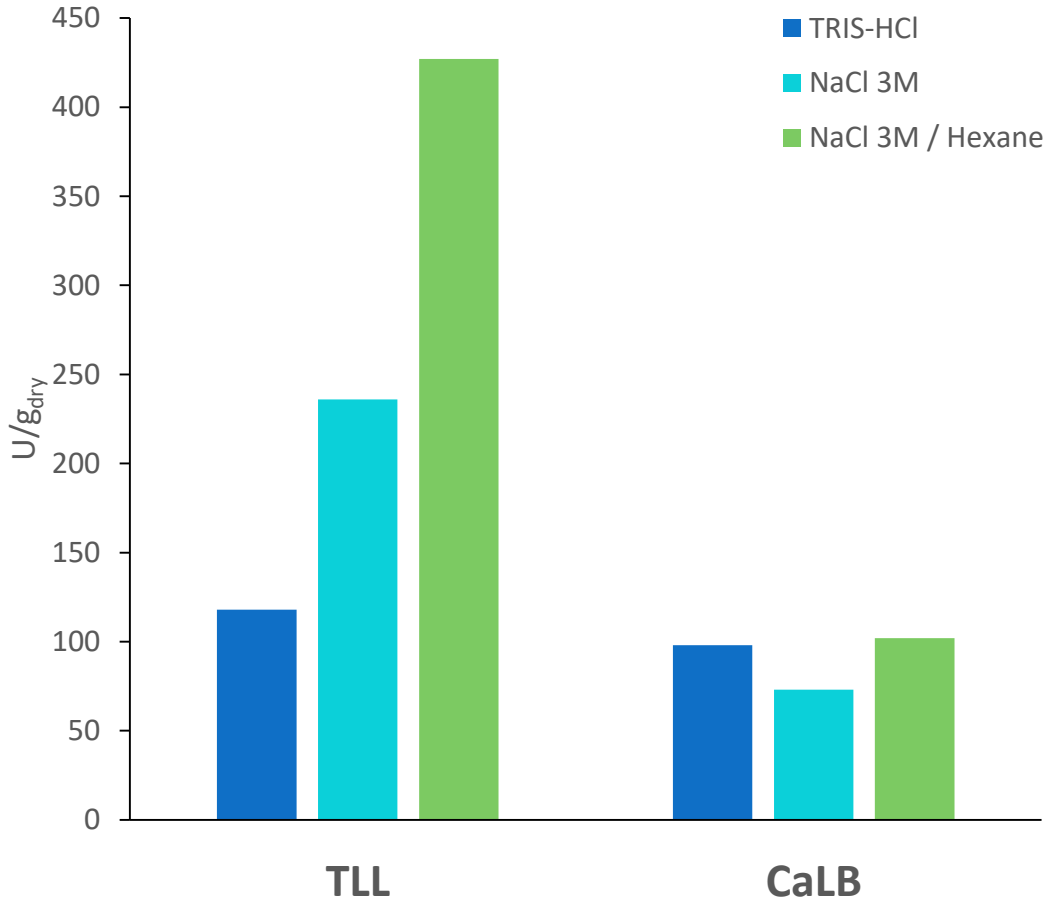
- Loading enzimatico: 632 U/g_{dry} (187 mg/g_{dry})
- Saggio di attività: idrolisi di una soluzione di maltosio al 25% in tampone citrato 10 mM (pH 4.5)

Immobilizzazione di lipasi su lolla di riso tramite adsorbimento e crosslinking

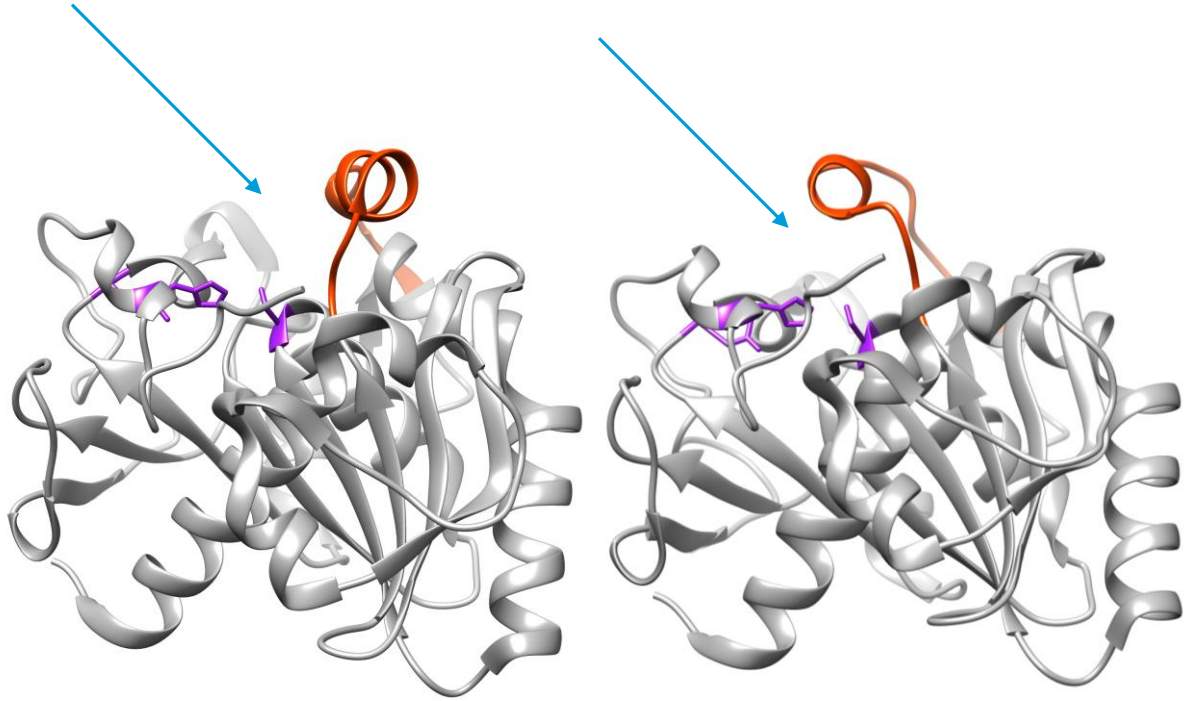
- Loading proteico: 15 mg/$g_{carrier}$
- Loading TLL: 2775 U/g_{dry}
- Loading CaLB: 4125 U/g_{dry}

- Condizione 1: TRIS-HCl, 0,1 M, pH 7
- Condizione 2: NaCl 3 M
- Condizione3: NaCl 3 M + crosslinking in emulsione di esano

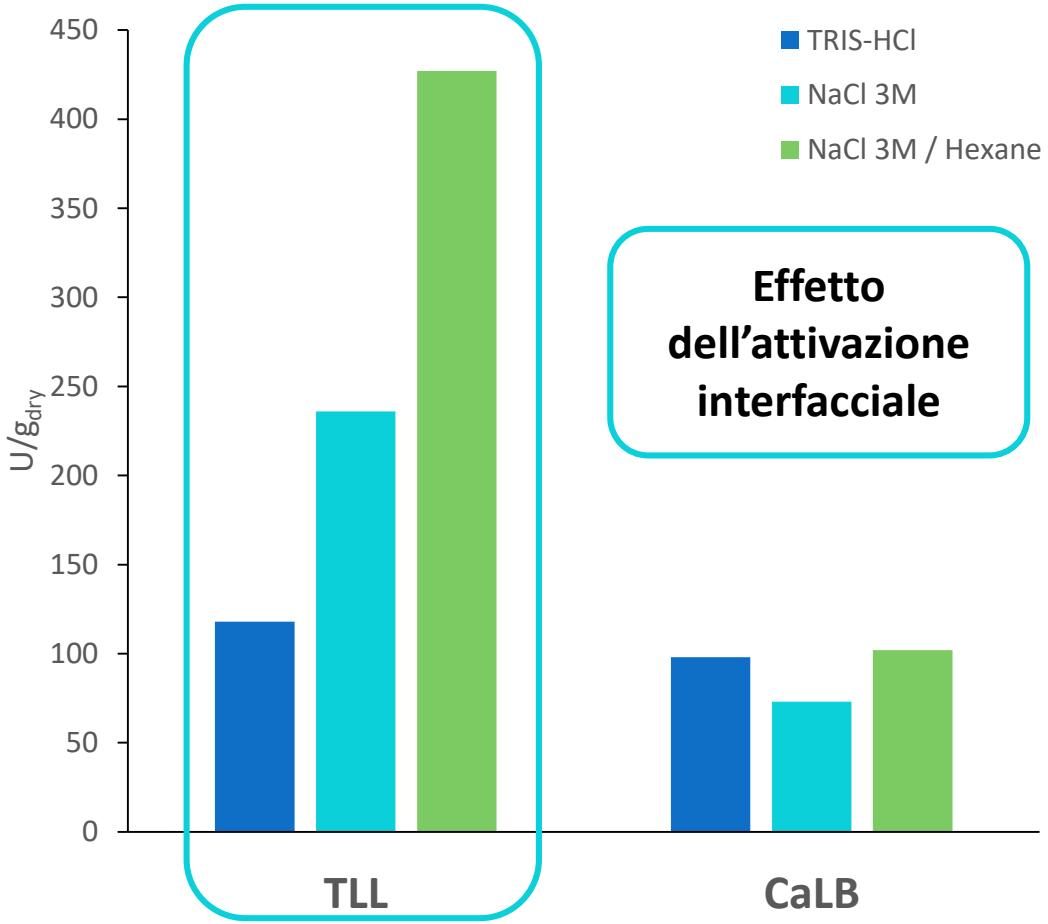
- Saggio di attività: idrolisi della tributirrina (emulsione acquosa)



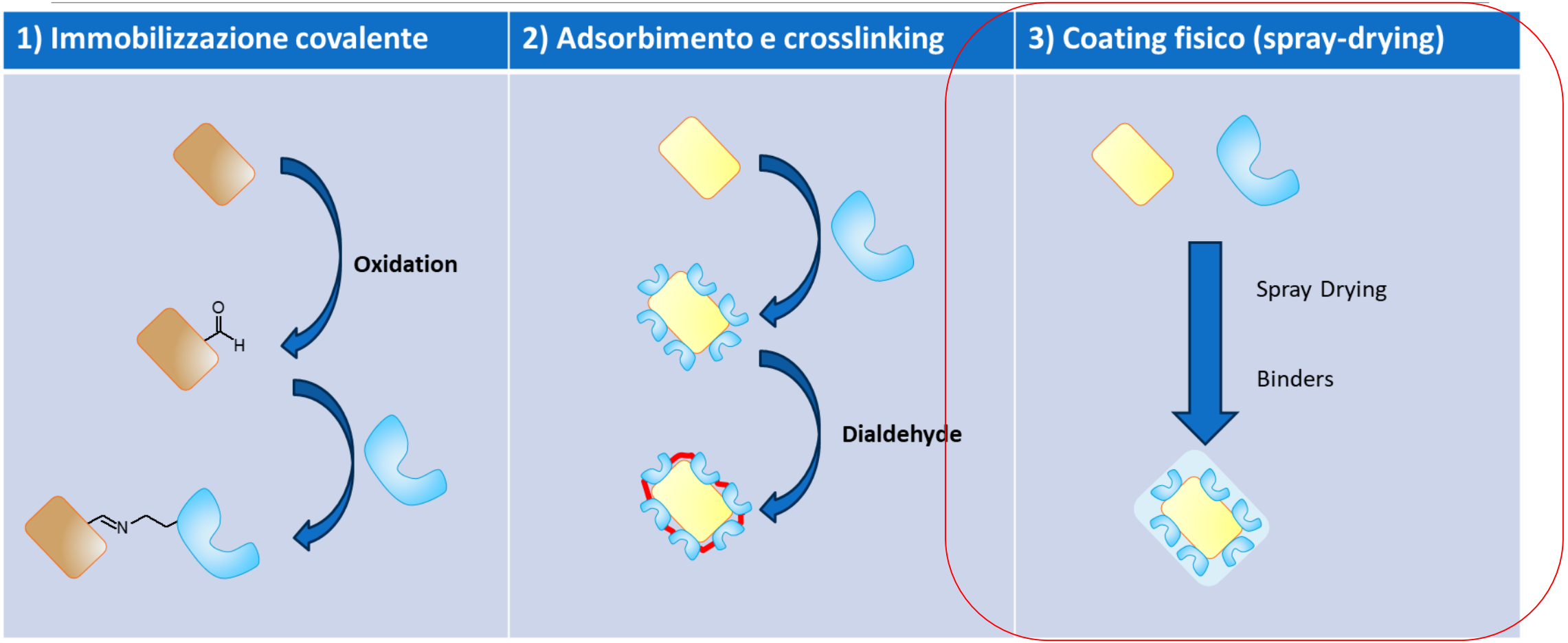
Immobilizzazione di lipasi su lolla di riso tramite adsorbimento e crosslinking



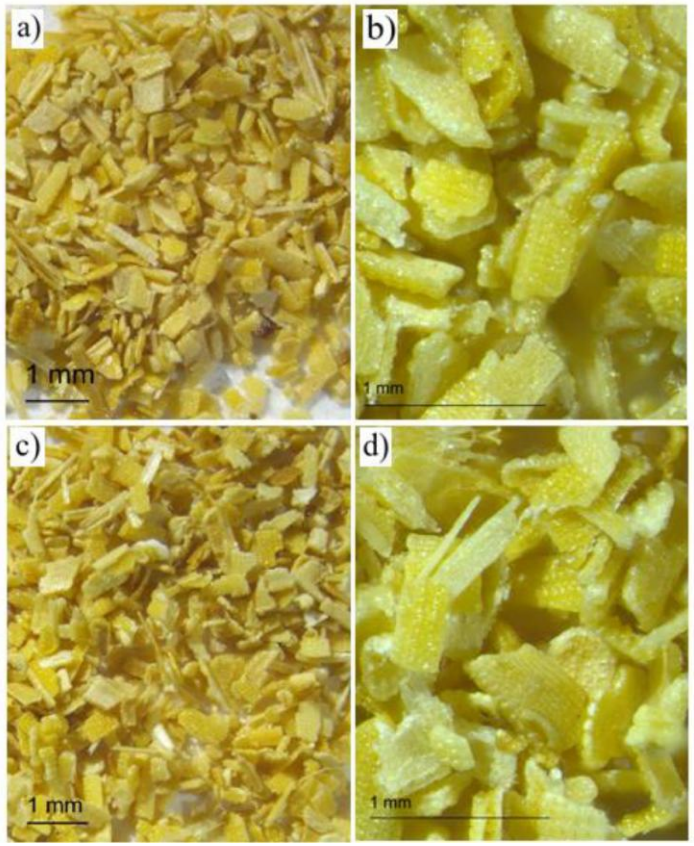
Conformazione aperta **Conformazione chiusa**

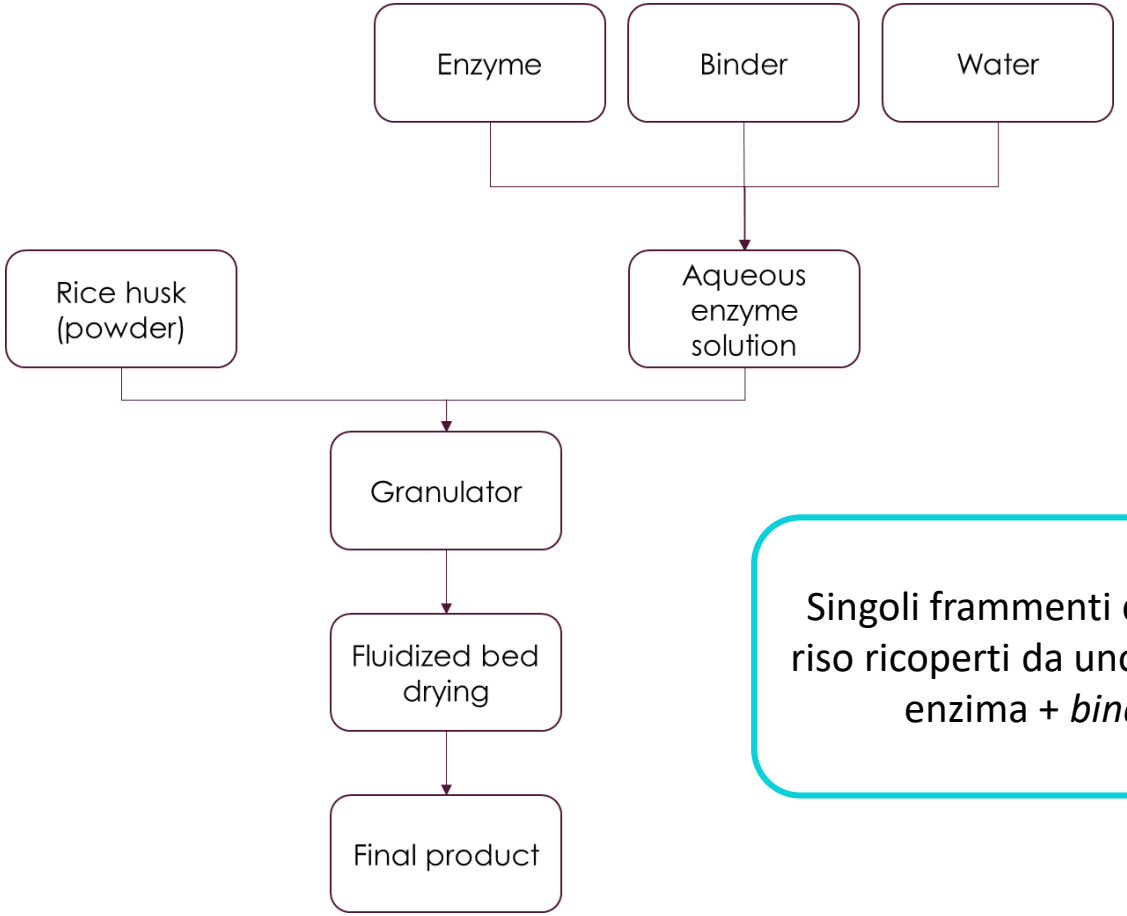


Immobilizzazione su lolla di riso – Stato dell'arte



Immobilizzazione di TLL su lolla di riso tramite spray-drying

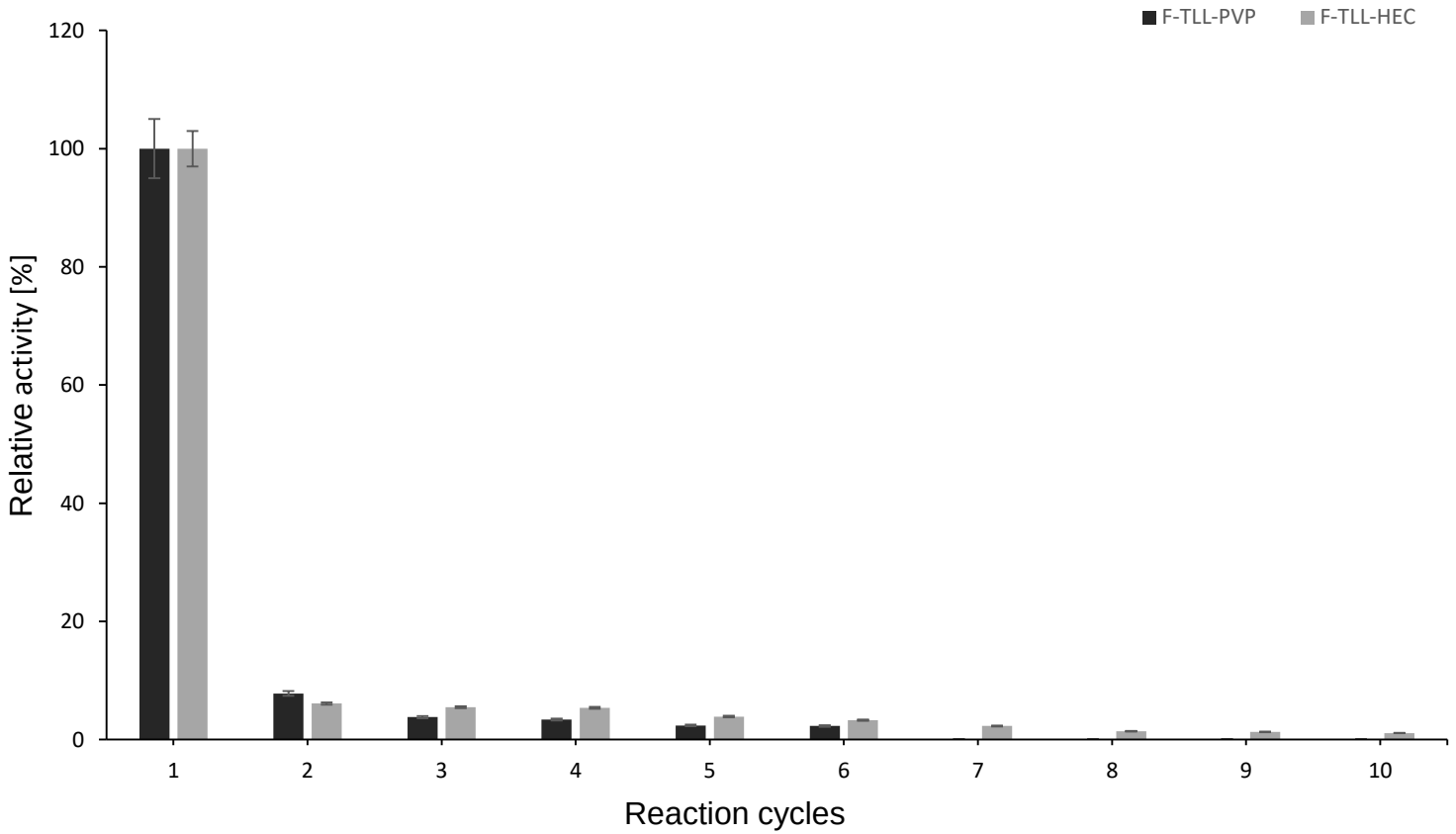




Singoli frammenti di lolla di riso ricoperti da uno strato di enzima + *binder*

M. Spennato et al., *EFB Bioeconomy Journal* **2021**, *1*, 100008

TLL spray-dried su lolla di riso – Uso in emulsione acquosa

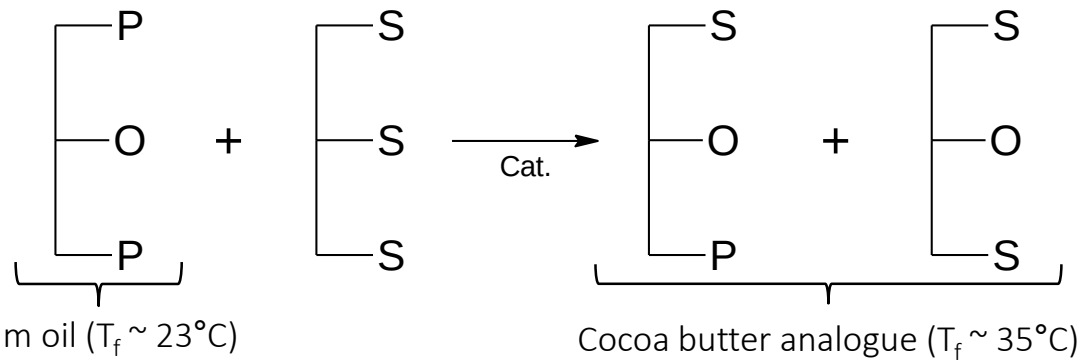


- PVP: poli(vinil pirrolidone)
- HEC: idrossietil cellulosa

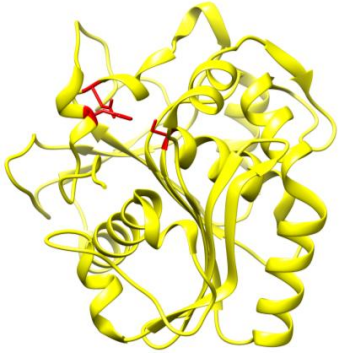
- Saggio di attività: idrolisi della tributirrina

…ma ha senso usare le lipasi in emulsione acquosa?

- Esempio di lipasi usata su scala industriale: **Lipozyme TL IM** (Novozymes, DK)
- Lipasi da *Thermomyces lanuginosus* (TLL)
- Immobilizzata su granulati porosi di silica insolubili in olio
- Lipasi sn-1,3 specifica
- Uso industriale nell'interesterificazione di trigliceridi
  - Produzione di **analoghi del burro di cacao** → $ 1.21 miliardi (2024)
  - Produzione di margarine (alternativa a idrogenazione catalitica)

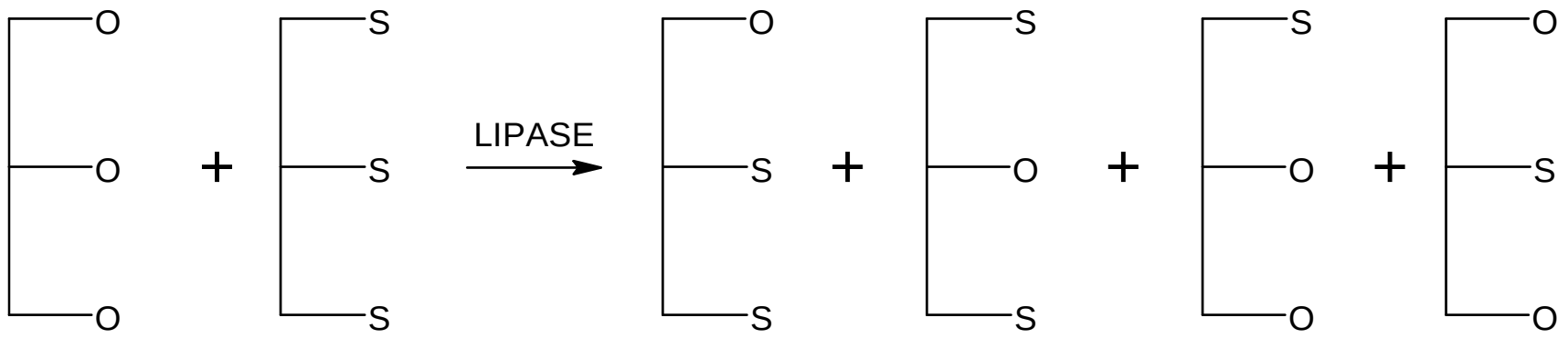


TLL



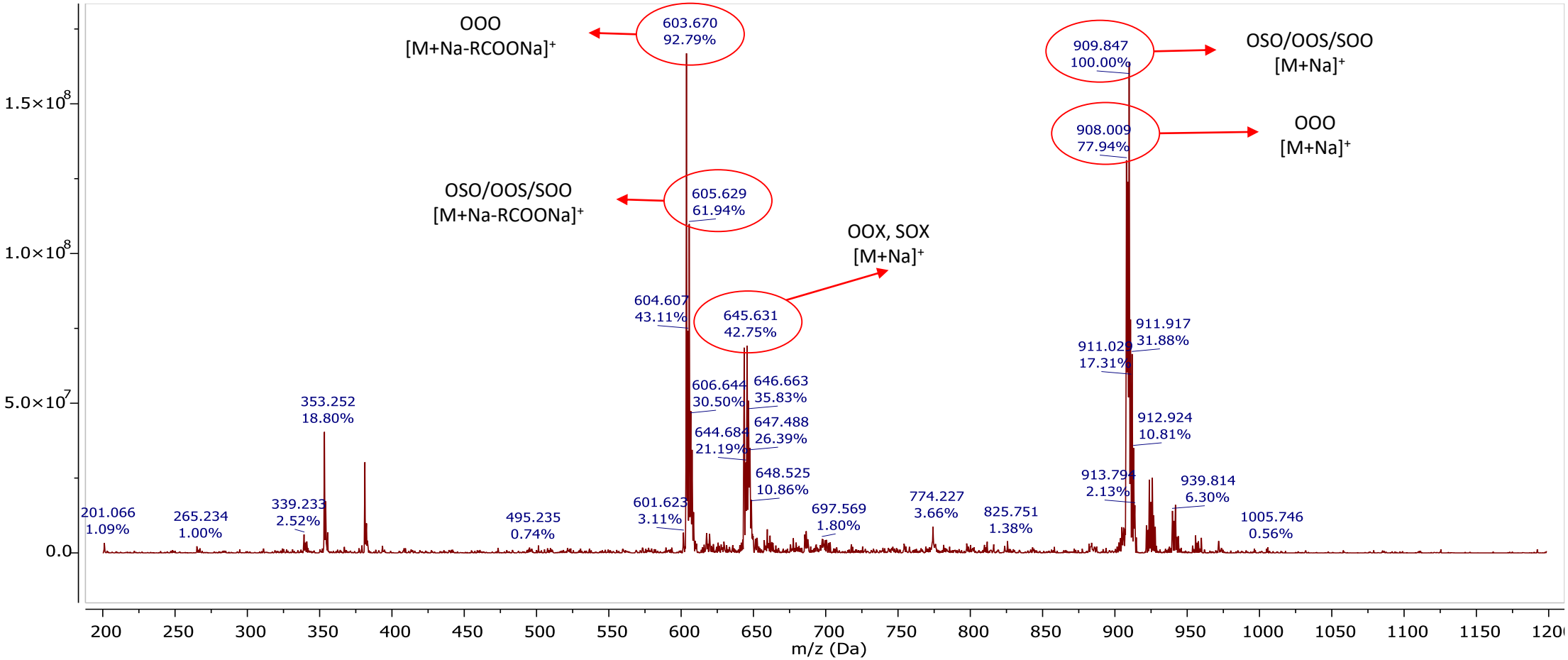
(*Lipozyme® TL IM*)

TLL spray-dried su lolla di riso – Uso in ambiente idrofobico

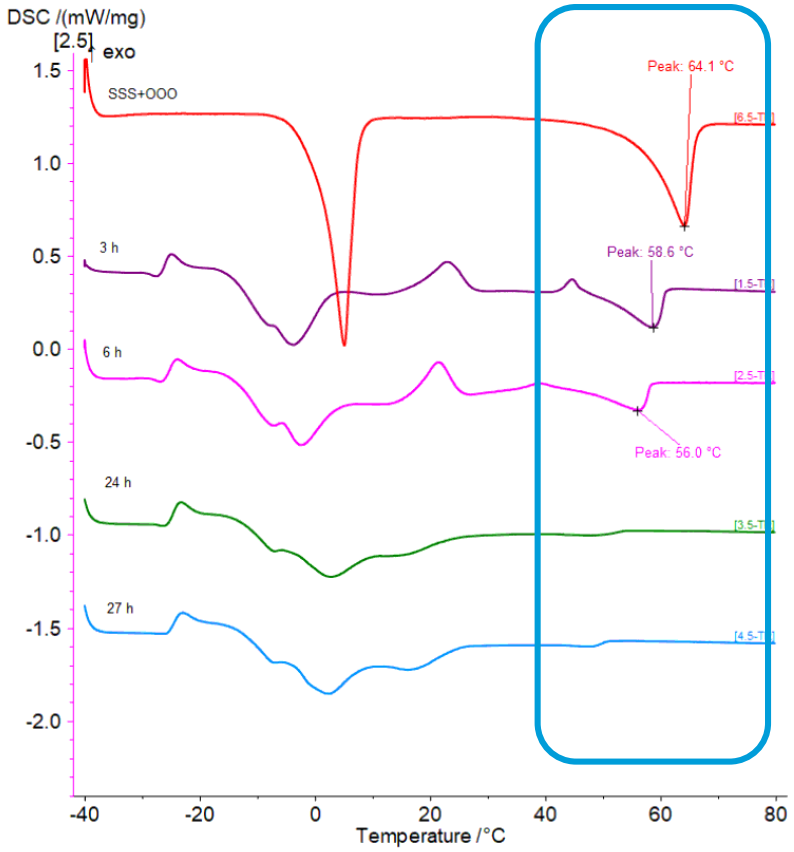


- S = acido stearico
- O = acido oleico
- Tristearina : trioleina = 27:73 w/w
- Reazione **solvent free**, T = 70°C, 72 h
- Preparazioni utilizzate: PVP-TLL e HEC-TLL
- Quantità di enzima: 10 wt.%

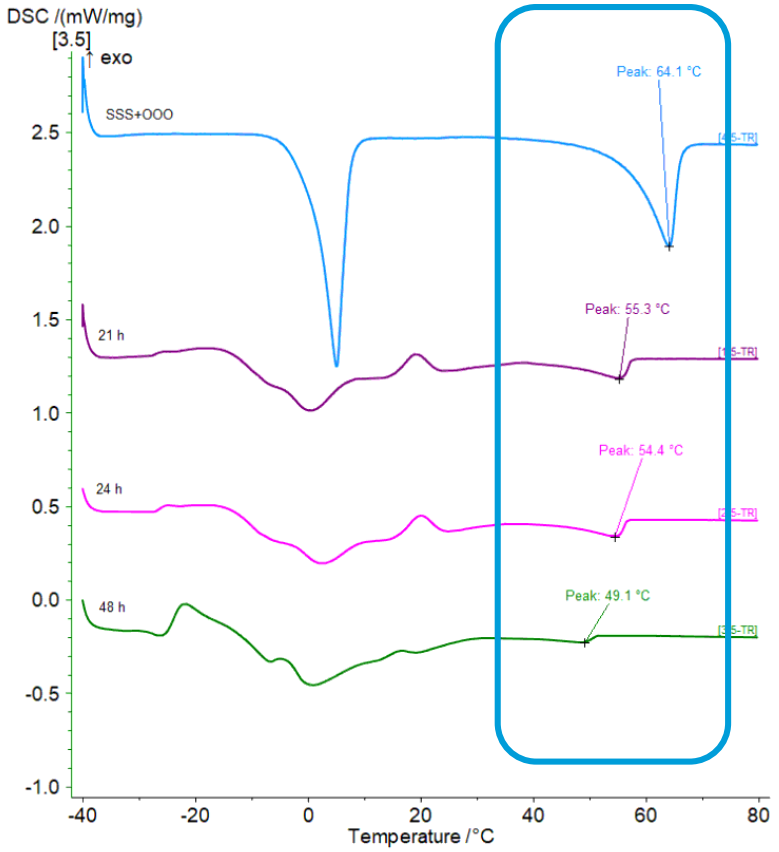
TLL spray-dried su lolla di riso – Uso in ambiente idrofobico



TLL spray-dried su lolla di riso – Uso in ambiente idrofobico

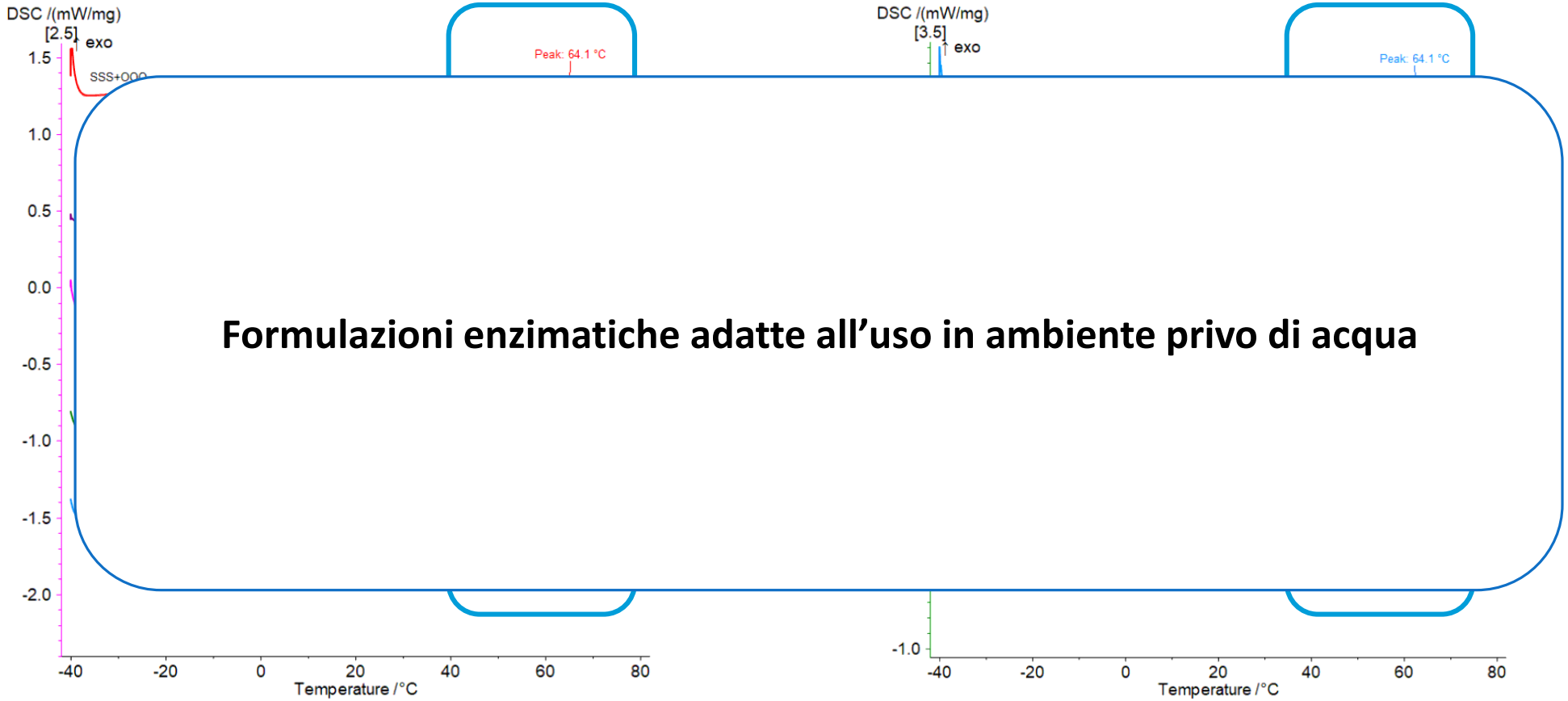


Primo ciclo



Secondo ciclo

TLL spray-dried su lolla di riso – Uso in ambiente idrofobico



Formulazioni enzimatiche adatte all'uso in ambiente privo di acqua

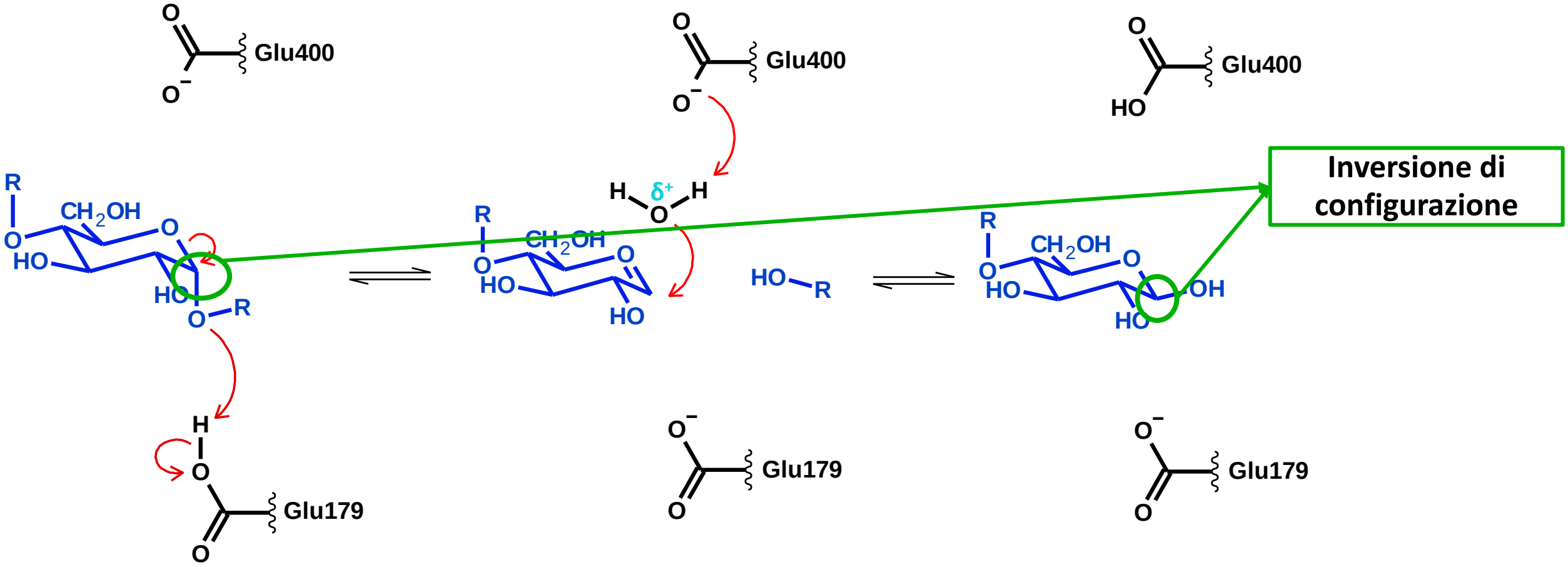
Primo ciclo

Secondo ciclo

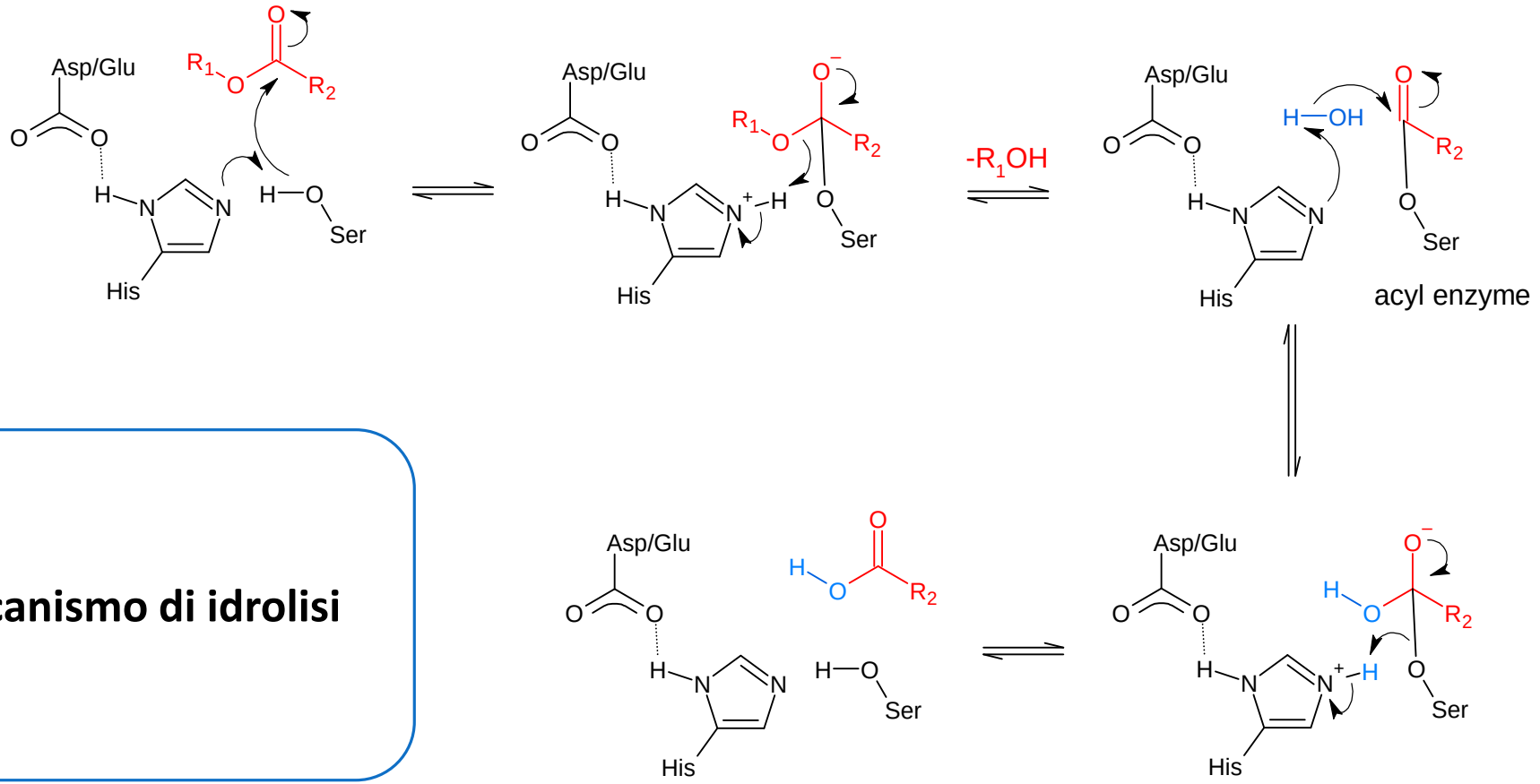
…e gli studi continuano…

01-03/2024	• Borsa di studio post-laurea bandita dal CIRCC (Consorzio Interuniversitario Reattività Chimica e Catalisi)
04/2024	• Inizio assegno di ricerca presso UNITS
11/2024	• Deposito domanda di brevetto europeo (Patent application no. EP25156168.4) basata su risultati non pubblicati ottenuti durante il dottorato
03/2025	• Pubblicazione paper: R. D'Orsi, C. Danielli, M. Spennato, E. Guazzelli, E. Martinelli, F. Asaro, L. Gardossi and A. Operamolla, *ChemSusChem* **2025**, e202500164 • Lavoro basato su studi basati su osservazioni sulla lolla di riso ottenute durante il dottorato

Meccanismo della glucoamilasi da *Aspergillus niger*



Lipasi

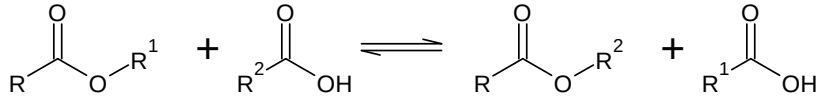


Meccanismo di idrolisi

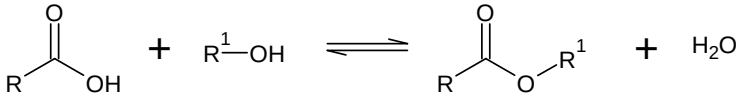
Altre reazioni catalizzate da lipasi

Hydrolysis

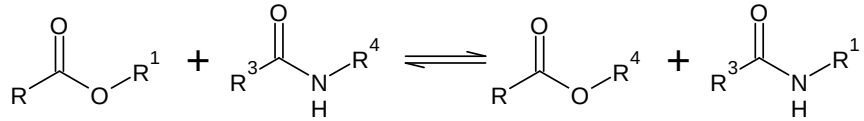
Acidolysis



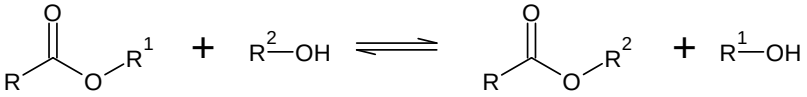
Esterification



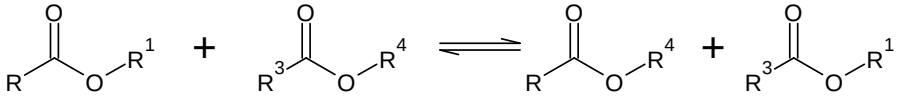
Aminolysis



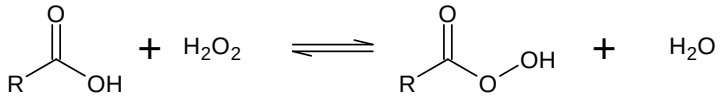
Alcoholysis



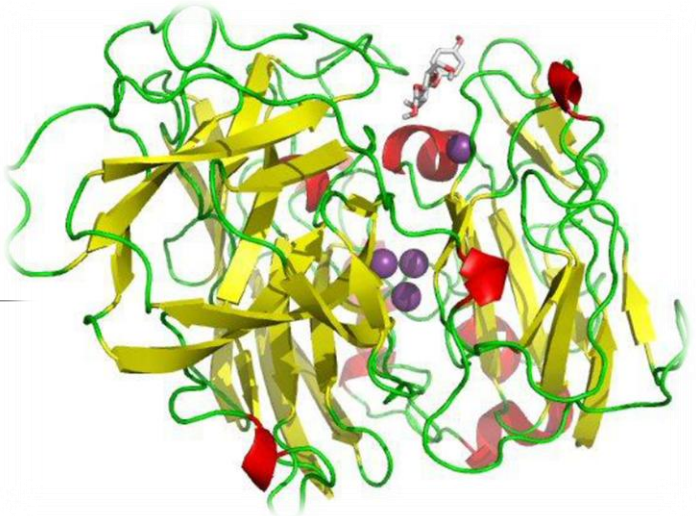
Interesterification



Epoxidation

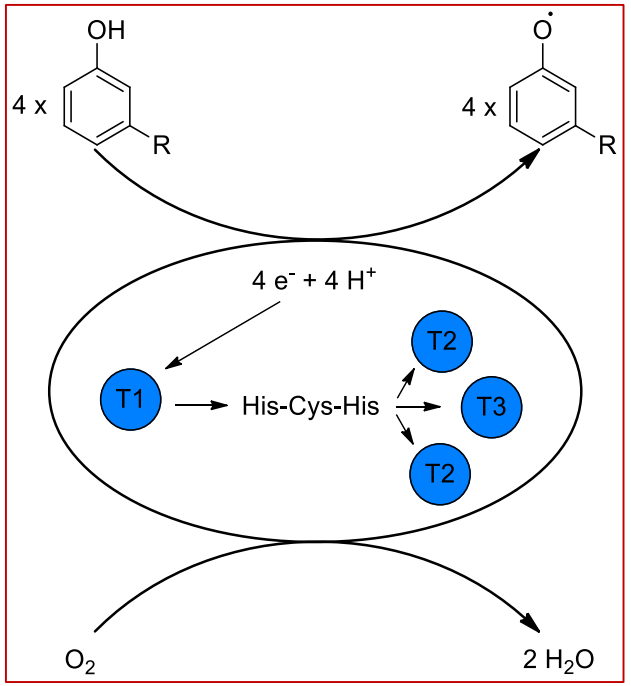
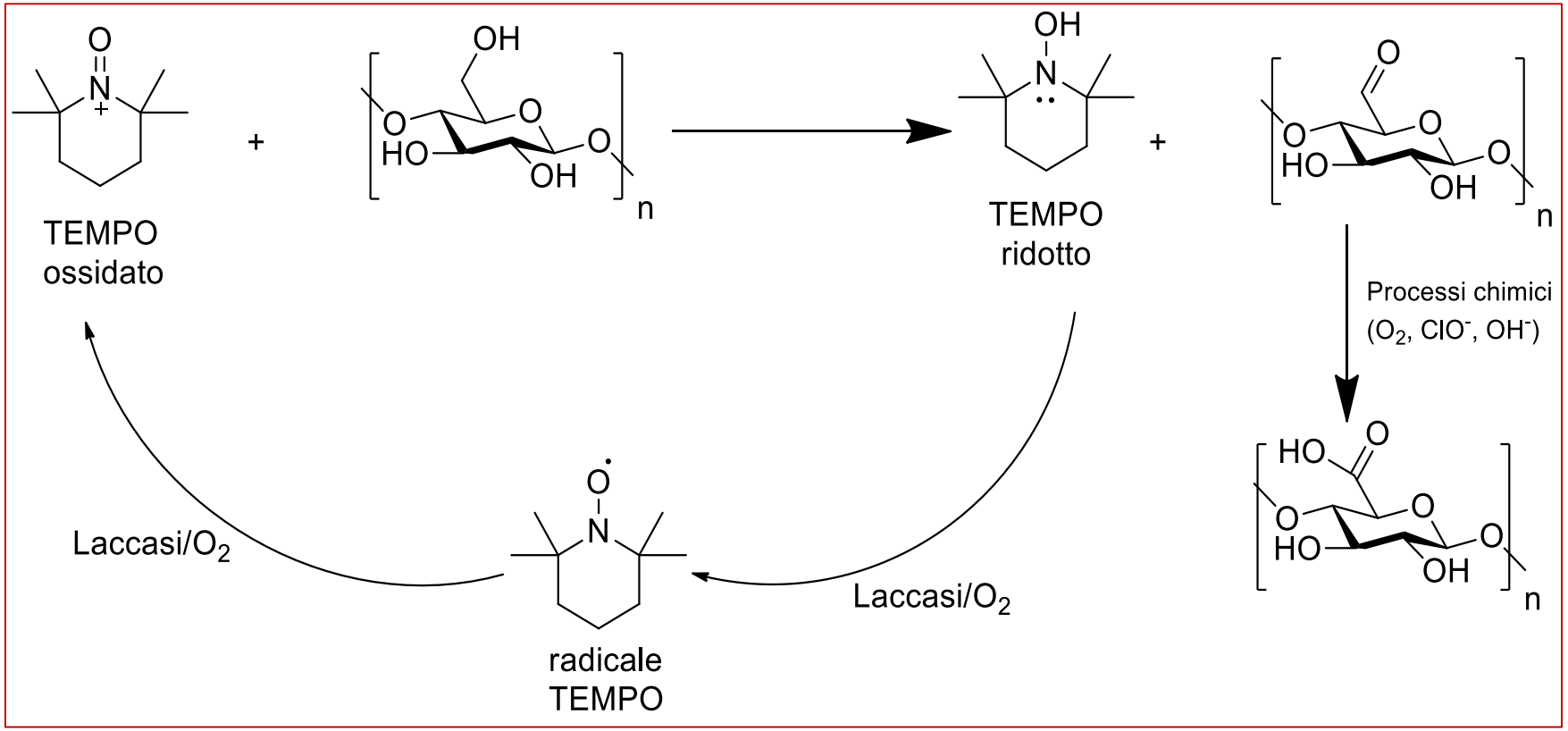


Laccases



Laccases belong to the class of multi-copper oxidoreductases (EC 1.10.3.2)

They catalyse the **reduction** of **oxygen to water** and the simultaneous **oxidation** of **phenolic substrates**.



TEMPO-Mediated enzymatic oxydation of rice husk