

Titolo della tesi (sperimentale): Characterization and use of laccase immobilized on silica nanoparticles for the oxidation of emerging pollutants.

Sessione di laurea: I^a dell' anno accademico 2014/2015

Tipo di laurea: Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria per l' Ambiente e il Territorio – Indirizzo: Tutela dell' Ambiente.

Candidato: Luca Sbardella

e-mail: sbardellaluca01@gmail.com

Matricola: 1252184

Relatore: Alessandra Poletti

Correlatori: Maite Moreira Vilar (Universidad de Santiago de Compostela), Adriana Arca Ramos (Universidad de Santiago de Compostela), Raffaella Pomi

Settore Scientifico Disciplinare del relatore: Area di Ingegneria Sanitaria e Ambientale

Nel presente lavoro di tesi è stato studiato il processo di immobilizzazione dell'enzima laccasi sulla superficie di nanoparticelle di silice con il fine di produrre un biocatalizzatore che presentasse caratteristiche migliori, in termini di stabilità e applicabilità, rispetto allo stesso enzima in forma libera. Lo scopo finale è stato quello di valutare le capacità ossidative dell'enzima immobilizzato nel processo di degradazione di tre contaminanti, appartenenti a tre diverse classi di composti recalcitranti: le tinte sintetiche, i composti distruttori endocrini e i composti farmaceutici e per la cura personale. Il progetto è stato sviluppato presso i laboratori della Facoltà di Ingegneria Chimica ed Ambientale dell'Università di Santiago di Compostela, nell'ambito del progetto Erasmus +.

Il rilascio nell'ambiente di composti refrattari alla degradazione biologica, come quelli considerati in questo studio, ha comportato negli ultimi anni una preoccupazione e un'attenzione crescente a causa dei loro effetti negativi sui comparti ambientali e su alcune funzioni vitali degli esseri viventi. Tra le diverse alternative per la loro rimozione, è presente la possibilità di degradare questi composti tramite l'utilizzo di funghi ligninolitici, i quali hanno la caratteristica di rilasciare enzimi extracellulari aventi un'alta capacità ossidativa e una bassa specificità di substrato; che possono quindi essere applicati per l'ossidazione di un'ampia classe di composti recalcitranti. Le due classi di enzimi appartenenti a

questa categoria sono le perossidasi e le laccasi. Tuttavia l'applicazione di enzimi, nella loro forma libera/solubile, è limitata a causa della loro bassa stabilità e dell'elevato costo di produzione, dovuto all'impossibilità di recuperare l'enzima. L'immobilizzazione enzimatica sulla superficie di supporti solidi è uno dei metodi più efficaci per aumentare l'attività enzimatica e la loro stabilità sotto condizioni rigide e lungo periodi prolungati. In questo studio le laccasi (un enzima multi-rame appartenente alla classe delle ossidoreduttasi) prodotte da due diversi funghi ligninolitici, la *Myceliophthora thermophila* (*Mt*) e la *Trametes versicolor* (*Tv*) sono state immobilizzate sulla superficie di nanoparticelle (NP) di silice, utilizzando un metodo denominato "Sorptions-Assisted-Immobilization" (SAI). Il metodo SAI prevede l'iniziale modifica delle nanoparticelle inserendo sulla loro superficie un gruppo amminico, la successiva aggiunta della laccasi e in finale l'aggiunta dell'agente di cross-linking, la glutaraldeide, che permette il legame tra i gruppi amminici delle nanoparticelle modificate e l'enzima. L'ultima operazione che si deve effettuare è il lavaggio del biocatalizzatore. Durante quest'ultima fase, si effettua la misura dell'attività enzimatica sia del pellet che del surnatante, in maniera tale da accertare che nel surnatante non ci sia un'elevata attività enzimatica; in quanto ciò sarebbe un segno di un'elevata perdita durante i lavaggi e quindi di un basso grado di immobilizzazione. Con il fine di massimizzare il Carico Enzimatico(...), il Rendimento di Immobilizzazione (...), e contestualmente minimizzare la "Perdita per Lavaggio", il processo è stato ottimizzato variando la quantità di laccasi applicata, sia per *Mt* che per *Tv*. Una volta trovata la dose ottima per le due laccasi, si è effettuata la coimmobilizzazione delle stesse, cioè si è ripetuto lo stesso processo con la metà della dose ottima sia di *Mt* che di *Tv* insieme. Nella seconda fase del progetto si è effettuata la caratterizzazione dei tre biocatalizzatori prodotti sotto diverse condizioni e in particolare sono stati paragonati con il corrispondente enzima libero. È stata studiata l'influenza del pH sull'attività istantanea mostrando come l'enzima libero e immobilizzato presentino uno stesso comportamento e in particolare un picco a pH 3. Incubando invece gli enzimi liberi e i nano biocatalizzatori prodotti a pH 5, 7 e 8.5 per un periodo di 15 giorni, è risultato che la laccasi immobilizzata è più stabile della libera in condizioni acide, neutre e alcaline. Sempre con il fine di valutare l'effetto dell'immobilizzazione sulla stabilità dei coniugati NP-laccasi, questi sono stati incubati per un periodo di 28 giorni in effluente reale da trattamento biologico secondario. Ripetendo l'esperimento con le laccasi libere, e confrontando i risultati, ne è risultato che il processo di immobilizzazione ha comportato un miglioramento sostanziale della laccasi in termini di stabilità in questo tipo di effluente. Inoltre, nell'ottica di un'applicazione in continuo, le laccasi immobilizzate sono state riutilizzate in dieci cicli consecutivi di ossidazione di un substrato modello (ABTS). Nella terza ed ultima fase sono state applicate le laccasi immobilizzate per la rimozione in batch di tre contaminanti rappresentativi di tre diverse classi di composti recalcitranti; il Verde di Metile, il bisfenolo A e il diclofenac. Nel caso del Verde di Metile, nell'arco delle 24 h di reazione, la laccasi ad alto potenziale redox (*Tv*) e le due laccasi coimmobilizzate hanno permesso una completa rimozione del colorante sintetico considerato; mentre usando la *Mt*, è stata maggiore la quota di colorante adsorbita sulle nano particelle rispetto alla quota rimossa per ossidazione. Nel caso del secondo contaminante considerato (bisfenolo A) si è ottenuta una rimozione completa sia da parte della laccasi

Tv che da parte del mix delle due; ottenendo anche elevati gradi di rimozione dopo solo 4 h di reazione. Tuttavia anche utilizzando la *Mt* immobilizza, è stato possibile ottenere una rimozione, seppur non completa, del bisfenolo A. Di seguito, è stata anche dimostrata la possibilità di riutilizzare l'enzima immobilizzata in un ipotetico processo di rimozione in continuo, attraverso cinque cicli consecutivi di ossidazione del bisfenolo A. In relazione all'ultimo contaminante considerato, il diclofenac, risultò che la *Mt* immobilizzata non è stata in grado di ossidarla, mentre utilizzando gli altri due biocatalizzatori prodotti si è ottenuta una rimozione pari all' 85% e 66%, rispettivamente per la *Tv* e il mix delle due laccasi; ciò a seguito delle 24 h di reazione.

Concludendo, la tecnica dell'immobilizzazione della laccasi su nanoparticelle di silice possiede grandi potenzialità nel campo della bioremediation di effluenti di varia natura. Infatti, le già favorevoli caratteristiche della laccasi, migliorate dal processo di immobilizzazione, le attribuiscono la capacità di ossidare un'ampia gamma di composti recalcitranti, rendendo allo stesso tempo fattibile la loro applicazione in appositi reattori enzimatici per l'eliminazione dei suddetti composti.