

Cercheremo di capire come utilizzare gli enzimi in processi tecnologici ed industriali.

## Esame Orale

- Enzimologia applicata
  - quali enzimi sono utili per i vari processi
  - sfruttamento della biodiversità – estremofili
    - metagenomica (usare informazione nel genoma dei microrganismi senza doverli coltivare)
  - immobilizzazione
  - ingegneria proteica
  - folding
    - chaperoni
    - misfolding (corpi di inclusione)

## Biocatalizzatori

### Catalisi

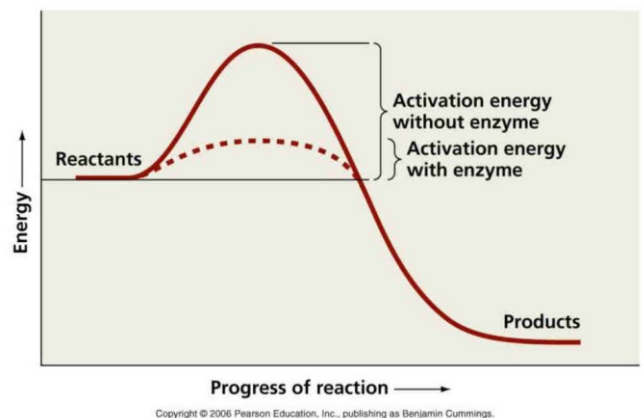
Le reazioni per procedere devono superare una barriera, detta energia di attivazione.

Molte reazioni spontanee non avvengono perché sono troppo lente (cinetica bassa). Queste reazioni possono essere accelerate mediante l'uso di catalizzatori.

I catalizzatori abbassano l'energia di attivazione.

Serve meno energia per farla iniziare e la reazione è più veloce.

Il catalizzatore non viene modificato dalla reazione.



Noi ci occuperemo di catalisi biologica. Gli enzimi sono biocatalizzatori. I biocatalizzatori sono spesso proteine, in alcuni casi RNA.

La biocatalisi si può effettuare con cellule intere oppure enzimi estratti e purificati.

Gli enzimi si producono spesso da DNA ricombinante.

Gli enzimi sono catalizzatori prodotti da organismi viventi. Sono un prodotto sostenibile. I microrganismi industriali che producono enzimi possono essere coltivati su terreni derivati da prodotti di scarto dell'industria.

### Principali proprietà degli enzimi

Gli enzimi accelerano le reazioni chimiche.

Gli enzimi lavorano in condizioni blande, di temperatura, pressione, pH.

Gli enzimi sono specifici.

L'attività degli enzimi può essere regolata.

L'enzima è una molecola complessa. In genere possiede un sito catalitico di dimensioni relativamente ridotte, che è circondato da una struttura di sostegno. Per catalizzare reazioni chimiche gli enzimi possono usare varie strategie. Durante la reazione si stabiliscono interazioni tra l'enzima ed il suo substrato.

Tecniche di ingegneria proteica possono essere usate per modificare l'enzima, oppure estrarre domini che possono essere inseriti in altri enzimi.

Le regioni dell'enzima che non sono coinvolte nella catalisi in genere sono coinvolte nella regolazione o nell'interazione con altre proteine.

L'enzima esce invariato da ogni ciclo di catalisi. Questi possono quindi essere usati in quantità ridotte e possono catalizzare la reazione per molte volte, fino a quando non perdono la loro struttura.

La stabilità è fondamentale per l'uso degli enzimi in biotecnologie.

I coenzimi sono molto importanti nella catalisi. Le deidrogenasi catalizzano reazioni di ossidoriduzione e sono associate al NAD come cofattore. Il cofattore deve essere rigenerato alla fine di ogni ciclo di reazione.

Gli enzimi sono catalizzatori specifici per la reazione e per il substrato.

Non tutti gli enzimi sono in realtà specifici. Alcuni enzimi accettano substrati diversi e alcuni possono anche catalizzare più di una reazione. Queste proprietà sono chiamate *promiscuità*.

Fattori importanti per l'attività degli enzimi sono:

- Temperatura

Gli enzimi hanno un optimum di temperatura a cui catalizzano la reazione in modo efficiente. Non è detto che alla temperatura di massima efficienza l'enzima sia stabile.

- pH

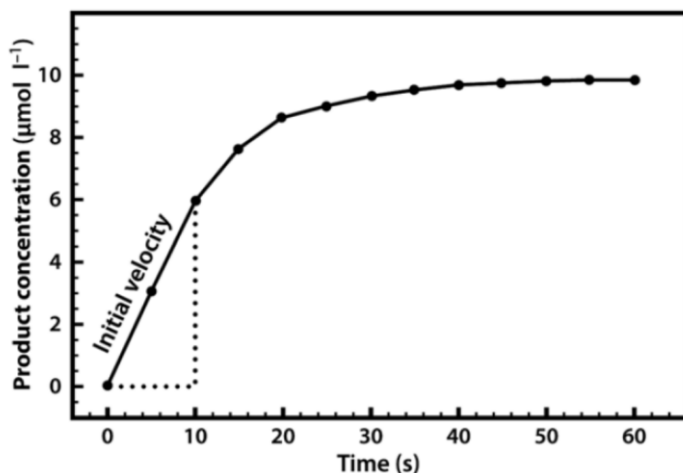
Ogni enzima ha un pH a cui lavora meglio

- Inibitori

L'attività degli enzimi può essere regolata. In biotecnologie bisogna stare attenti ad effetti di inattivazione che non ci aspettavamo. La reazione catalizzata dagli enzimi può portare a prodotti che inibiscono lo stesso enzima.

Quando misuriamo la velocità di una reazione enzimatica, possiamo accorgerci che spesso la reazione parte velocemente e dopo rallenta.

Se vogliamo aumentare la resa della reazione, in questo caso, possiamo aumentare la concentrazione dell'enzima. Va considerato che l'enzima ha un costo, quindi per ogni utilizzo va valutato il rapporto costo/beneficio. Vanno usati enzimi stabili. Se l'enzima diminuisce la sua attività troppo presto dovrà essere sostituito, con relativi costi.



### Definizioni

Quando parliamo di enzimi, parliamo di unità enzimatiche, che è un concetto che si riferisce all'attività dell'enzima.

Una **unità** di enzima è la quantità di enzima che permette di catalizzare la conversione di una certa quantità di substrato nell'unità di tempo, a determinate condizioni di temperatura, pH.

In una preparazione enzimatica acquistata per esperimenti di laboratorio sono sempre presenti altre molecole che non sono enzimi, quali stabilizzatori o impurità prodotte durante il processo di

produzione. È importante quindi valutare l'**attività specifica**, cioè il numero di unità di enzima per mg di prodotto totale.

Il **numero di turnover** (costante catalitica  $K_{cat} = s^{-1}$ ) è il numero di molecole di substrato che vengono convertite in prodotto nell'unità di tempo da una singola molecola enzimatica. L'unità di misura è il reciproco del tempo.

La **costante di efficienza catalitica** ( $K_{cat} / K_m$ ) è un parametro usato per valutare le performance degli enzimi.

### **Quali sono gli enzimi utilizzati al livello industriale?**

Gli enzimi sono divisi in 6 classi, in base alla reazione che catalizzano.

Gli enzimi più usati sono le *idrolasi*, che a loro volta si dividono in varie famiglie a seconda del substrato preferito. Tra queste troviamo le *carboidrasi* (42%), proteasi (30%), lipasi (8%) ed altri (20%).

La maggior parte degli enzimi di cui parleremo non ha di per se un valore elevatissimo. Gli enzimi industriali devono avere un costo contenuto, per essere usati in grandi quantità.

Novozymes ha lanciato un enzima, Spirizyme, che permette di migliorare l'uso di biomasse, per ricavarne zuccheri che possano poi essere fermentati. Questo enzima catalizza l'idrolisi del trealosio.

### **Proprietà dell'enzima in processi biotech rispetto a proprietà *in vivo***

- *In vivo*
  - Specificità
  - Regolabilità
  - Efficienza catalitica

Nel caso del biodiesel, prodotto da trigliceridi, si aggiungono proprietà di importanza industriale.

- Stabilità

L'enzima può essere usato a lungo

- Riutilizzabilità

L'enzima deve essere riutilizzabile in maniera sequenziale in più cicli della stessa reazione. (come la stabilità)

- Processività ( $K_{cat}$ )
- Facilità di recupero

L'enzima deve essere facilmente recuperabile e separabile dai prodotti della reazione

- Robustezza alle condizioni di reazione e di processo

L'enzima deve essere stabile alle condizioni di reazione, quali temperatura, pH e pressione, e deve essere stabile nel solvente utilizzato

## Da dove provengono gli enzimi industriali più utilizzati

Vanno differenziati enzimi che vengono estratti e purificati dall'organismo che li produce, ed enzimi che vengono prodotti in modo ricombinante. In quest'ultimo caso ciò che ci interessa è la sequenza.

Originariamente le fonti di enzimi più utilizzati erano le piante oppure gli organismi animali (ad esempio enzimi per la produzione del formaggio).

Questi enzimi funzionano molto bene, ma vanno purificati e c'è sempre la necessità di ottenere gli organismi produttori.

Adesso si è passati a pensare di utilizzare gli stessi enzimi, prodotti però in microorganismi.

Coltivare cellule batteriche o di lievito è in molti casi più economico che ottenere animali o piante da cui ricavare gli stessi enzimi in ampie quantità.

Spesso gli enzimi prodotti da microorganismi sono più semplici dal punto di vista funzionale e strutturale, e quindi più semplici da utilizzare. In ogni caso enzimi ricavati da piante ed animali sono tutt'oggi importanti, tra questi le proteasi.

Ad oggi circa il **90%** del mercato degli enzimi ad uso industriale si basa su enzimi ricavati da microorganismi. I motivi sono:

- I microorganismi sono robusti dal punto di vista metabolico, sopportano condizioni anche molto diverse. Sono versatili nell'utilizzo di terreni di coltura.
- Sono facili da far crescere e propagare
- Hanno richieste nutrizionali semplici
- Sono facili da manipolare sia dal punto di vista genetico che logistico.
- La produzione di enzimi da microorganismi non è condizionata da eventi stagionali.

## Esempio di transizione nella produzione di enzimi da mammiferi a microorganismi

Un caso importante è quello degli enzimi che si usano nella coagulazione del latte per la produzione di formaggio (approfondire da slide + articoli).

Enzimi di origine animale o da piante sono ancora molto usati e difficilmente sostituibili in alcuni casi, specialmente nella formulazione di sostanze ad uso medico (farmaci).

## Microorganismi più utilizzati

Tra i batteri più utilizzati abbiamo *Bacillus*, *Streptomyces* ed *Escherichia coli*.

Tra i funghi troviamo *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma (reesei)*, enzimi per la digestione delle biomasse), *Aspergillus* e *Schizosaccharomyces pombe*.

La maggior parte degli enzimi che utilizziamo proviene da un numero estremamente limitato di microorganismi, spesso perché le case produttrici si sono specializzate nell'utilizzo di un certo tipo di microorganismi.

## Purificazione

Il grado di purezza dell'enzima dipende molto dal suo successivo utilizzo. La purificazione è uno dei processi più lunghi e costosi nella produzione di enzimi.

Per molte applicazioni non è necessario purificare l'enzima; basta prendere il microorganismo produttore, romperle e fare un estratto grezzo, che verrà poi usato nella reazione.

La purezza dell'enzima è sempre un dato presente nelle specifiche di produzione della casa produttrice. Possono esserci comunque problemi, quindi è importante utilizzare il parametro **attività specifica**. Se l'enzima non è purificato, il campione in analisi può contenere anche altri enzimi.

## **Passaggi nella produzione di enzimi**

- Sintesi

Dobbiamo mettere il microorganismo produttore nelle condizioni migliori per produrre l'enzima. Se l'enzima viene prodotto per via ricombinante si procede allo stesso modo.

- Recupero

Si preleva il microorganismo produttore, si lisa la membrana e si ottiene l'estratto grezzo

- Purificazione
- Formulazione

Un prodotto commerciale deve avere caratteristiche standardizzate e deve essere stabile.

Un primo step è decidere se commercializzare una produzione liquida oppure una preparazione solida o granulare. Questo dipende sia dal tipo di conservazione che vogliamo utilizzare, sia dall'utilizzo che si deve fare dell'enzima.

## **Stabilizzazione**

Un enzima può essere più o meno stabile, ma in ogni caso se non preservato tenderà a perdere la sua attività nel tempo. Quindi vanno ridotti i contaminanti, quali microorganismi indesiderati che producono enzimi che possano degradare la preparazione.

È importante evitare la denaturazione dell'enzima; ci sono molte sostanze utilizzabili come stabilizzatori, quali anioni, cationi, oppure piccole molecole quali, ad esempio, il *glicerolo* o il *sorbitolo*. Gli zuccheri limitano la denaturazione riducendo l'attività dell'acqua.

Polimeri idrofilici.

## **Standardizzazione**

Bisogna garantire la standardizzazione tra i vari lotti di produzione dell'enzima, in modo da poter utilizzare l'enzima in maniera ripetibile.

Ogni preparazione enzimatica è accompagnata da delle specifiche ed informazioni sul prodotto e sul suo utilizzo.

Alcuni ceppi sono considerati non ottimali nella produzione industriale di enzimi. I motivi possono essere ad esempio la bassa produzione. Si possono fare in questo caso delle modifiche al ceppo originario con tecniche di ingegneria proteica, oppure inserire la sequenza ricombinante in un altro ceppo più efficiente.

Per la produzione di enzimi ricombinanti si utilizzano per lo più batteri e lieviti, ma gli enzimi possono anche essere prodotti in insetti, cellule di mammifero o medium privi di cellule. La scelta dipende sempre dall'utilizzo del prodotto finale.

Fattori importanti sono:

- Dimensione della proteina da produrre
- Legami disolfuro nell'enzima ricombinante
- Necessità di glicosilazione
- Modifiche post traduzionali.

Non tutti i microorganismi sono in grado di effettuare le stesse modifiche post traduzionali. Se si vuole produrre una proteina glicosilata bisogna attenzionare il sistema di produzione. E. coli non esegue la glicosilazione. Bisogna capire se la glicosilazione è importante. Se questa è necessaria bisogna scegliere un organismo in grado di fare glicosilazione.

## **Campi di applicazione di enzimi industriali**

Rimanda alla lettura delle review da lei date.

Le idrolasi sono gli enzimi sicuramente più utilizzati, soprattutto nell'industria alimentare.

Nel tessile si usano anche ossidoreduttasi, quali perossidasi, catalasi e laccasi.