

*Lucia Gardossi,
Cynthia Ebert,
Valerio Ferrario
Dipartimento di Scienze
Farmaceutiche
Università di Trieste
gardossi@units.it
Paolo Braiuca,
Alessandra Basso
SPRIN Srl, Trieste
www.sprintechnologies.com
Lisa Vaccari
Sincrotrone-Elettra
Trieste*

IMMOBILIZZAZIONE DI ENZIMI

OTTIMIZZAZIONE DI BIOCATALIZZATORI INDUSTRIALI

Gli enzimi utilizzabili industrialmente sono spesso caratterizzati da una mancanza di stabilità a lungo termine nelle condizioni di processo e da difficoltà nel loro recupero e riciclo. Questi problemi possono essere superati immobilizzando gli enzimi su supporti solidi, cosicché i biocatalizzatori vengono impiegati come particelle insolubili.

La biocatalisi e le biotecnologie industriali in genere già permettono di produrre una vasta gamma di prodotti chimici ad alto valore aggiunto (per es. materiali di partenza per farmaci, tensioattivi, polimeri) mediante la modifica e la valorizzazione di materie prime di origine sintetica. Più recentemente, l'attenzione si è focalizzata sulla possibilità di sviluppare nuovi processi biocatalitici efficienti in grado di valorizzare economicamente biomasse e prodotti di scarto agro-industriali, quali ad esempio zuccheri, cel-

lulosa, amido, oli, ecc. La competitività dei processi biocatalizzati rispetto a quelli chimici classici viene spesso compromessa dalla scarsa efficienza dei biocatalizzatori disponibili. Sono richieste un'elevata stabilità del biocatalizzatore nelle condizioni operative del processo, la facilità del suo recupero e riciclo: tali parametri incidono tecnicamente ed economicamente sulla fattibilità di un processo industriale. Una maggiore stabilità enzimatica e la possibilità di riciclo si ripercuotono sulla produttività del catalizzatore (kg prodotto/kg enzi-

ma), e quindi sul costo dell'enzima per kg/prodotto. Questi problemi possono essere talvolta superati immobilizzando gli enzimi su supporti solidi insolubili. In linea di principio, l'immobilizzazione dovrebbe fornire i seguenti vantaggi: a) aumentata stabilità, b) possibilità di riciclo o di uso in continuo, c) facile separazione dalla miscela di reazione, d) modulazione delle proprietà catalitiche, e) prevenzione di contaminazioni proteiche nel prodotto, f) prevenzione di contaminazioni microbiche. Le tecniche di immobilizzazione più diffuse possono essere raggruppate in quattro categorie

- adsorbimento, deposizione, formazione di legami ionici o comunque di legami non covalenti;
- legame covalente (particolarmente usato per enzimi isolati);
- intrappolamento in gel polimerici (particolarmente adatto per immobilizzare cellule intere), membrane o capsule;
- cross-linking di enzimi.

Più di recente, sono stati proposti materiali innovativi, quali silicati mesoporosi, idrogels, "polimeri intelligenti" (smart polymers), e metodi di intrappolamento non convenzionali, che, tuttavia, essendo

ancora in via di sperimentazione, hanno finora un'assai limitata applicabilità a livello industriale.

Un esempio spesso citato di come l'immobilizzazione efficiente di enzimi abbia consentito l'applicazione di processi biocatalizzati a livello industriale è rappresentato dalla produzione di acido 6-amminopenicillanico (6-APA) per idrolisi della penicillina G, catalizzata dalla penicillina G amidasi (penicillina amidoidrolasi, E.C. 3.5.1.11). La produttività è di 600 kg di 6-APA per kg di enzima immobilizzato.

Nell'immobilizzazione dell'enzima al supporto il legame può sfruttare semplicemente le interazioni idrofobiche e di van der Waals, o interazioni più forti, come quelle ioniche. Più adatta per le applicazioni industriali è tuttavia un'interazione con formazione di un legame covalente, poiché offre il vantaggio che l'enzima non può essere rilasciato dal supporto solido. In ogni caso la scelta del metodo è strettamente legata al tipo di processo al quale il biocatalizzatore viene destinato. Per esempio, biocatalizzatori impiegati in solventi organici normalmente possono venir semplicemente adsorbiti fisicamente al supporto, in quanto la proteina avrà scarsa tendenza a staccarsi dal suppor-

Homology (Comparative) Protein Modelling: Costruzione di strutture di nuovi enzimi a partire da enzimi omologhi con struttura tridimensionale nota. È possibile considerare anche i substrati, i cofattori, o altre variabili che possono influenzare la struttura degli enzimi.

Molecular Mechanics/Molecular Dynamics: L'approccio tradizionale allo studio della struttura degli enzimi e dell'interazione enzima-substrato utilizza campi di forza e algoritmi computazionali avanzati. Questo metodo può essere usato per il refining di strutture proteiche ottenute con homology modelling o per modellare motifs strutturali non modellati per omologia. L'esperienza nello studio sull'effetto del mezzo di reazione sulla struttura degli enzimi e l'accesso a clusters di calcolo rendono possibile ottenere una simulazione dettagliata in tempi ragionevoli.

3D-QSAR for prediction of enzyme stability: Dall'insieme di dati strutturali di enzimi e dalle misure sperimentali della loro stabilità è possibile costruire un modello per la previsione quantitativa della stabilità enzimatica. Il modello può dare indicazioni sui motifs strutturali che possono aumentare la stabilità e può essere utilizzato per la selezione "in silico" dei mutanti con le proprietà migliori. Un modello degli enzimi che vengono da organismi estremofili è già disponibile.

GRID surface description: Il metodo computazionale GRID calcola le energie di interazione tra una piccola sonda chimica (corrispondente ad un gruppo chimico) e una serie di punti disposti tridimensionalmente sulla proteina.

Il risultato corrisponde ad una matrice tridimensionale di valori di energie di interazione, chiamate "Molecular Interaction Field" (MIF).

GRID-PCA: Lo studio delle differenze fra enzimi che appartengono alle stesse famiglie e/o mutanti. Il metodo aiuta nell'identificazione dell'effetto delle mutazioni sulle proprietà degli enzimi (selettività di substrato, attività, stabilità). Il risultato di questi calcoli può essere una guida per lo sviluppo razionale di enzimi. Si possono correlare quantitativamente le differenze alle condizioni sperimentali per costruire dei modelli matematici grazie all'analisi statistica multivariata.

3D-QSAR for prediction of enzyme selectivity: Il metodo può predire quantitativamente la selettività verso il substrato a partire da poche misure sperimentali. Se è disponibile la struttura dell'enzima (sia ottenuta con cristallografia a raggi X che con tecniche di omologia) è possibile predire l'enantioselettività. È possibile costruire data base di librerie enzimatiche utili nella scelta dell'enzima adatto per il processo.

Metodi statistici multivariati: PCA e PLS possono essere applicati all'analisi di insiemi complessi di dati. L'analisi di dati può essere unita a strategie di disegno sperimentale per analizzare delle condizioni di reazione dove devono essere controllate molte variabili.

COSMO-RS: Metodo basato sulla termodinamica statistica che permette di calcolare le proprietà termo-fisiche delle molecole e di conseguenza predire l'entità delle loro interazioni, simulando così sistemi di reazione diversi.

to per ripartirsi nel mezzo idrofobico. Viceversa, in ambiente acquoso è preferibile disporre di enzimi ancorati stabilmente al supporto, per evitare il distacco dell'enzima, che potrebbe anche rappresentare un inquinante indesiderato del prodotto di reazione. Processi che richiedono condizioni di reazione drastiche, in sistemi ad alta viscosità e in presenza di sollecitazioni meccaniche implicheranno anch'essi procedure di immobilizzazione che garantiscano un legame stabile tra supporto ed enzima. Infine è da sottolineare che il processo di immobilizzazione non deve provocare significativa perdita di attività catalitica.

Spesso l'immobilizzazione e le relative condizioni di reazione vengono stabilite con un approccio puramente empirico. Ciò comporta un dispendio di tempo per sviluppare i protocolli di immobilizzazione, specie per nuovi enzimi. Decenni di studi hanno messo in luce come non sia concepibile un unico supporto di immobilizzazione rispondente ad esigenze di enzimi e processi diversi, ma come occorra piuttosto disporre di un ventaglio di opzioni tecnologiche in grado di valorizzare adeguatamente il potenziale catalitico dell'enzima. Sorge quindi l'esigenza di sviluppare dei metodi e dei criteri per guidare razionalmente la scelta del supporto e della tecnologia di immobilizzazione. Gli sviluppi più recenti sono basati sull'aumentata conoscenza della struttura e del meccanismo catalitico degli enzimi. In tal senso, metodi computazionali diversi possono venir utilizzati in maniera integrata per raccogliere informazioni sulle proprietà strutturali degli enzimi e di conseguenza permettere di operare una scelta mirata dei supporti ottimali per la loro immobilizzazione.

Interazioni idrofiliche/idrofobiche tra l'enzima ed il supporto per l'immobilizzazione

Il calcolo e la visualizzazione delle regioni idrofobiche ed idrofiliche sulla superficie degli enzimi permettono di prevedere le zone della proteina che possono stabilire le corrispondenti interazioni con i supporti, sulla base della natura idrofilica/idrofobica di questi ultimi. Il supporto influenzerà quindi l'orientamento dell'enzima durante l'immobilizzazione.

Questo risulta di particolare importanza per le lipasi. Infatti, mentre la maggior parte degli enzimi presentano sulla loro superficie una netta prevalenza di residui idrofilici uniformemente distribuiti, le lipasi presentano una struttura bipolare. La Fig. 1 illustra come, mediante il metodo computazionale GRID (vedi Tabella della pagina precedente), si possa visualizzare una netta separazione tra le zone della superficie della lipasi da *Candida rugosa*, dove una faccia idrofobica circonda il sito attivo, mentre quella diametralmente opposta è idrofilica. Il metodo computazionale GRID calcola le energie di interazione tra una piccola sonda chimica (corrispondente ad un gruppo

chimico) e una serie di punti disposti su una griglia tridimensionale sulla proteina. Il risultato corrisponde ad una matrice tridimensionale di valori di energie di interazione, chiamate "Molecular Interaction Field" (MIF) [1]. Le immagini dimostrano come le lipasi siano enzimi evoluti specificatamente per agire all'interfaccia acqua/olio su substrati idrofobici insolubili. Pertanto la faccia idrofilica della proteina rimane rivolta verso la fase acquosa, mentre quella idrofobica interagisce con il trigliceride. Tale polarizzazione è stata riscontrata in tutte le lipasi analizzate, provenienti sia da organismi eucarioti sia da procarioti, seppure in proporzioni diverse. Pertanto, ci si può attendere che l'orientazione e persino la conformazione della lipasi possano cambiare significativamente quando questa è adsorbita su supporti di diversa idrofilia. In letteratura, sono riportati alcuni esempi in cui si evidenziano notevoli differenze di attività catalitica e di stabilità quando si passa da supporti idrofobici a quelli idrofilici [2, 3].

Va inoltre sottolineato che, nel caso di enzimi espressi in microrganismi eucarioti, va considerata anche la possibilità che l'enzima subisca una glicosilazione co-traduzionale (cioè avvengono durante l'assemblamento della catena polipeptidica e prima che questa assuma la sua conformazione finale) [4].

Per esempio, la glicosilazione di specifici residui di asparagina (N-glicosilazione) normalmente comporta l'inserimento di 8-25 residui di mannosio sulla superficie dell'enzima. Evidentemente, l'introduzione di questa ampia area idrofilica andrà a modificare il bilancio idrofilico-idrofobico dell'enzima e di conseguenza anche le interazioni che si possono instaurare con il supporto.

Localizzazione dei residui responsabili dell'attacco covalente dell'enzima al supporto

I metodi di immobilizzazione dovrebbero favorire l'attacco dell'enzima con un orientamento tale da permettere il corretto avvicinamento dei substrati. Metodi di modellismo molecolare

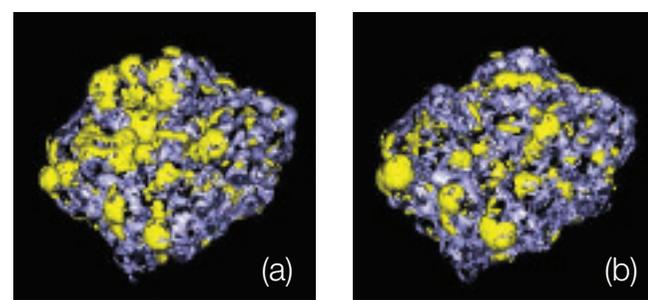
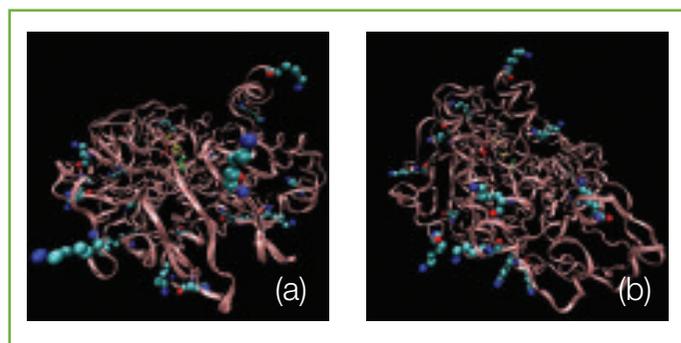
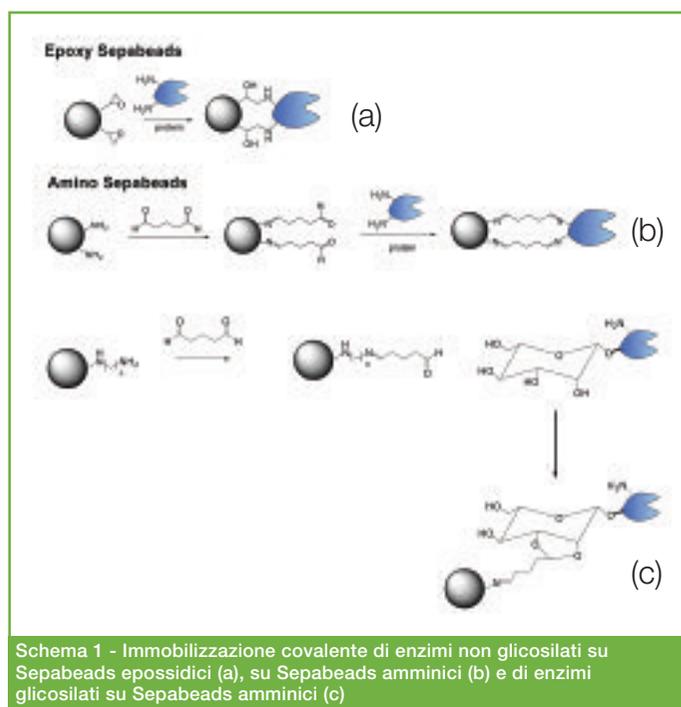


Fig. 1 - Lipasi da *Candida rugosa*, struttura aperta (a), struttura chiusa (b); in giallo le zone idrofobiche sulla superficie, particolarmente concentrate nella regione del sito attivo ed in blu le parti idrofiliche. Le aree sono state calcolate con metodo GRID partendo dalle strutture cristallografiche della proteina



possono evidenziare la posizione degli amminoacidi presenti sulla superficie dell'enzima che possono essere coinvolti nella formazione di legami covalenti con i gruppi funzionali del supporto. Nei casi in cui la struttura tridimensionale della proteina non sia nota, metodi di confronto per omologia con proteine dotate di sufficienti livelli di omologia con l'enzima di interesse permettono di costruire i modelli strutturali incogniti. Questi ultimi vengono successivamente raffinati mediante simulazioni di dinamica molecolare.

La maggior parte dei metodi immobilizzazione covalente sfrutta la natura nucleofila dei gruppi ϵ -amminici dei residui lisinici superficiali che vengono fatti reagire con funzionalità epossidi-

che del polimero (Schema 1a). Si possono altresì impiegare polimeri amminici pre-attivati con glutaraldeide che, reagendo con i residui lisinici portano alla formazione di legami imminici (Schema 1b). Tuttavia, esistono studi che hanno evidenziato la possibilità di sfruttare la reattività dei gruppi carbossilici e tiolici delle proteine per realizzare l'ancoraggio covalente dell'enzima al supporto, modulando adeguatamente le condizioni operative e soprattutto il pH di immobilizzazione.

Nel caso delle lipasi, quando molecole idrofobiche si avvicinano al sito attivo, l'enzima modifica la sua conformazione in modo tale da rendere la tasca idrofobica del sito attivo più accessibile ai substrati. Le Fig. 1b e 2b indicano come un *loop*, detto anche *lid* (*coperchio*) copra il sito attivo della lipasi da *Candida rugosa* mascherandone l'idrofobicità, per cui la lipasi si presenta chiusa e non-attivata, con un'estesa superficie idrofila, solvabile dall'acqua. Viceversa, nelle Fig. 1a e 2a si osserva l'attivazione della lipasi mediante sollevamento del coperchio che rivela l'apertura del sito attivo idrofobico capace di accogliere ampi substrati idrofobici. Pertanto, il metodo di immobilizzazione non deve impartire all'enzima un'eccessiva rigidità conformazionale. La Fig. 2b evidenzia la localizzazione dei residui superficiali di lisina sulla lipasi da *Candida rugosa*, indicando la presenza di un residuo lisinico proprio all'apice del *lid*. È quindi ragionevole attendersi che un'immobilizzazione covalente dell'enzima che sfrutti la reattività dei suoi residui lisinici possa condurre ad un'eccessiva rigidità conformazionale e, conseguentemente, ad una minore attività catalitica. Pertanto per questa lipasi andrebbe perseguita una tecnica di immobilizzazione che coinvolga residui amminoacidici diversi o di tipo non covalente [5].

Analisi dell'effetto della glicosilazione sull'interazione enzima-supporto

Analogamente a quanto descritto precedentemente, l'analisi strutturale della superficie della proteina può mettere in luce i siti di glicosilazione ed evidenziare un loro possibile coinvolgimento nell'interazione con il supporto.

Poiché il grado di glicosilazione degli enzimi dipende dal tipo di microorganismo nei quali vengono espressi, lo stesso enzima proveniente da fonti microbiche diverse può richiedere un tipo di supporto diverso. La dimostrazione di ciò deriva da uno studio in cui sono state confrontate le proprietà di due penicillina G amidasi (PGA) immobilizzate. La PGA più comunemente impiegata nell'industria è un dimero che, essendo espresso in *E. coli*, non è glicosilato, pur presentando quattro potenziali siti di glicosilazione nella proteina cataliticamente attiva.

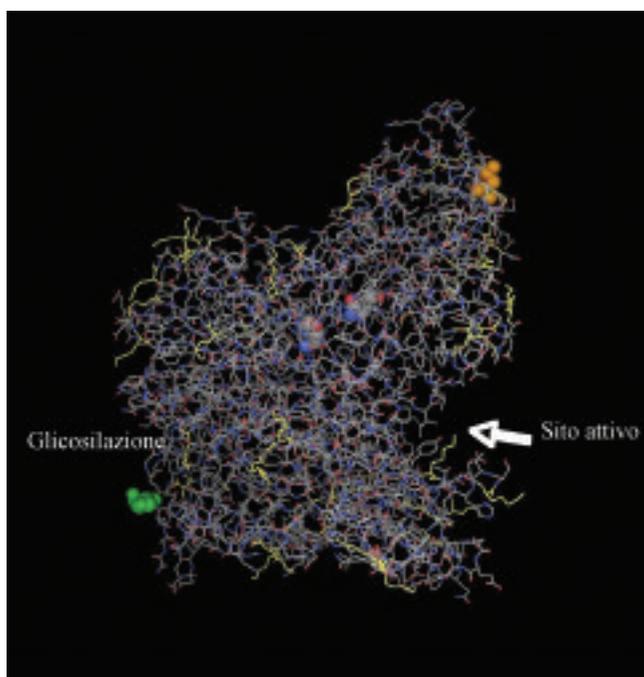


Fig. 3 - Struttura tridimensionale della PGA da *P. rettgeri* (PGA_P) espressa in *P. pastoris*, ottenuta mediante tecniche di omologia. Il residuo evidenziato in verde corrisponde al sito di glicosilazione (Asn A:20) sulla catena α , mentre il residuo in arancio (Asn B:428) è il sito di glicosilazione sulla catena β . In giallo sono indicati i residui di lisina sulla superficie, che possono reagire con un supporto opportunamente funzionalizzato.

In collaborazione con l'International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) di Trieste sono state studiate le proprietà di una PGA da *Providencia rettgeri*, espressa nel lievito *Pichia pastoris*; la provenienza da un microrganismo eucariota fa sì che la proteina subisca glicosilazione.

La struttura tridimensionale della PGA da *P. rettgeri* è stata ottenuta grazie a tecniche di modellazione per similarità (*homology modelling*). I siti di N-glicosilazione nella sequenza proteica sono stati identificati con opportuni metodi computazionali (*protein motifs searching tool*). La N-glicosilazione delle proteine espresse in *Pichia pastoris* avviene in corrispondenza di una specifica sequenza, mediante formazione di un legame fra l'asparagina e due residui di N-acetilglucosamina [6].

Il sito di glicosilazione può legare glicani diversi, generalmente formati da 8-25 residui di mannosio, portando così ad una notevole eterogeneità nella struttura dello stesso enzima. L'N-glicosilazione avviene nel reticolo endoplasmatico ed è una modifica co-traduzionale, per cui la derivatizzazione precede il ripiegamento della proteina (*folding*). Per due dei quattro siti di glicosilazione (Asn B:241 e Asn B:388) la probabilità di glicosilazione è trascurabile, poiché, essendo situati nella parte centrale (*core*) della proteina, la loro modifica indurrebbe pesanti cambiamenti

conformazionali, tali da ridurre o azzerare l'attività catalitica. L'inaccessibilità delle due Asn non comporta l'impossibilità di glicosilazione; è stato tuttavia dimostrato che i glicani sono praticamente assenti in posizioni inaccessibili. Questo potrebbe essere ascritto ad una degradazione delle proteine glicosilate e con conformazione non corretta.

Gli altri due siti di glicosilazione, Asn A:20 e Asn B:428, indicati rispettivamente in verde e in arancio nella Fig. 3, sono situati sulla superficie della proteina.

Con l'ausilio del metodo computazionale GRID sono state calcolate le energie tra la superficie della proteina e una sonda ossidrilica "virtuale" e così valutare l'entità dell'interazione fra l'acqua e gli atomi dei due diversi residui di asparagina superficiali. I risultati hanno indicato che l'Asn A:20 è molto più esposta al solvente e che il glicano eventualmente presente non induce notevoli modifiche conformazionali nella proteina.

Questa osservazione è in accordo con i dati sperimentali (analisi elettroforetica), che mostrano una glicosilazione preferenziale sull'unità α piuttosto che sulla catena β . Come si può osservare nella Fig. 3, il residuo Asn A:20 dista più di 35 Å dal sito attivo e il glicano si trova così dalla parte diametralmente opposta del sito catalitico. Da qui nasce l'idea di sfruttare la posizione del glicano per migliorare l'efficienza dell'enzima immobilizzato. Infatti, promuovendo l'interazione fra il glicano e il supporto, l'attività dell'enzima immobilizzato dovrebbe essere influenzata positivamente: a) promuovendo le interazioni idrofiliche con il supporto, si può realizzare un orientamento ottimale dell'enzima, lasciando il sito attivo pienamente accessibile; b) viene ridotta la probabilità di legame fra il supporto e quei residui di lisina prossimi al sito attivo. In effetti, 11 dei 37 residui di lisina distribuiti sulla superficie di PGA (quasi il 30% del totale) sono situati intorno al sito catalitico (Fig. 3, residui gialli), per cui un loro coinvolgimento nel legame al supporto comprometterebbe l'accesso del substrato al sito attivo.

In linea di principio, è ragionevole prevedere che uno o più glicani fortemente polari, che presentano tantissimi gruppi ossidrilici, debbano determinare delle notevoli interazioni non covalenti ed indurre una differente reattività chimica nell'enzima glicosilato.

Nel caso dell'immobilizzazione della PGA glicosilata espressa in *P. pastoris*, sono stati selezionati come supporto d'immobilizzazione i prodotti Sepabeads® recanti funzionalità amminiche.

Sepabeads® sono resine di forma perfettamente sferica costituite da copolimeri metacrilici e prodotte da Resindion Srl Milano (Mitsubishi Chem. Corp.).

Pur essendo chimicamente omogenee, le Sepabeads sono disponibili in un'ampia variabilità di dimensione dei pori, dimensione particellare, funzionalizzazione chimica, natura idrofo-

bica/idrofilica. Inoltre associano una spiccata stabilità mecano-smotica ad una geometria interna caratterizzata da grandi superfici piane atte a favorire i processi di trasferimento di massa.

Questo permette di poter ottimizzare in maniera mirata l'efficienza dell'enzima immobilizzato all'interno di uno specifico processo.

La scelta delle Sepabeads amminiche è stata dettata innanzitutto dalla loro minor idrofobicità rispetto ai corrispondenti polimeri epossidici in maniera da promuovere le interazioni con la porzione glicosidica dell'enzima e quindi favorire una corretta orientazione della proteina. Inoltre, mediante pre-attivazione dei gruppi amminici con glutaraldeide si è voluto permettere non solo la formazione di legami amminici con i residui lisinici ma anche la formazione di acetali ciclici con i residui di mannosio che presentano gruppi idrossilici *cis* vicinali (Schema 1c) La formazione di acetali ciclici pentatomici è termodinamicamente favorita, e, a differenza degli acetali lineari, questi acetali sono stabili in un più ampio intervallo di pH. [7] È stato verificato che il legame fra il supporto e il mannoside è stabile: non si osserva rilascio di mannoside .

I risultati ottenuti immobilizzando le due diverse PGA sui medesimi supporti indicano come la PGA glicosilata permetta di ottenere un raddoppio dell'attività espressa (da 221 a 491 U/g di biocatalizzatore secco) e ottenere una maggiore stabilizzazione (Fig. 4). I dati quindi suggeriscono che, mediante una

oculata scelta del polimero, è possibile sfruttare la presenza del glicano per orientare efficientemente l'enzima e per introdurre ulteriori legami covalenti stabilizzanti tra la proteina e il suo supporto.

Ottimizzazione dei fenomeni di diffusione e solvatazione

Dal momento in cui l'enzima viene immobilizzato, questo diventa un sistema catalitico distinto che va studiato e considerato in maniera diversa rispetto all'enzima nativo. Spesso l'enzima immobilizzato esprime una ridotta efficienza a causa delle barriere diffusionali dovute alla presenza del supporto solido. Normalmente si ritiene che un'ampia porosità sia l'elemento che assicuri un elevato trasporto di massa e buone cinetiche di reazione. Sicuramente la porosità ha un ruolo cruciale nelle reazioni nelle quali il prodotto di reazione agisce da inibitore enzimatico, come nel caso dell'idrolisi, catalizzata dalla PGA, della penicillina G a 6-APA (acido-6-amminopenicillanico) e acido fenilacetico. Quest'ultimo agisce da inibitore dell'attività della PGA e pertanto deve poter velocemente allontanarsi dal biocatalizzatore e ripartirsi nel mezzo di reazione.

Una valutazione dell'efficienza dei fenomeni diffusivi all'interno dei polimeri porosi può essere ottenuta mediante l'accoppiamento della spettroscopia FT-IR-MCT (Fourier Trasformed Infra Red Microspectroscopy) con la luce di sincrotrone. In uno studio eseguito da SPRIN Srl (spin-off dell'Università degli studi di

Trieste che si occupa di biocatalisi e immobilizzazione enzimatica) in collaborazione con Sincrotrone-ELETTRA (Trieste) è stato possibile seguire visivamente ed in maniera quantitativa le cinetiche di diffusione di un reattivo recante un gruppo cromoforo (acido-3-nitropropionico) all'interno della matrice porosa (Fig. 5).

La maggior sensibilità dell'analisi tramite MCT e l'elevata brillantezza della luce di sincrotrone permettono di ottenere spettri a elevata risoluzione in grado di fornire informazioni altrimenti non apprezzabili, fornendo un nuovo approccio valido e veloce per lo studio di cinetiche di reazione e meccanismi di diffusione su supporti solidi opachi.

Oltre alla porosità, anche la natura

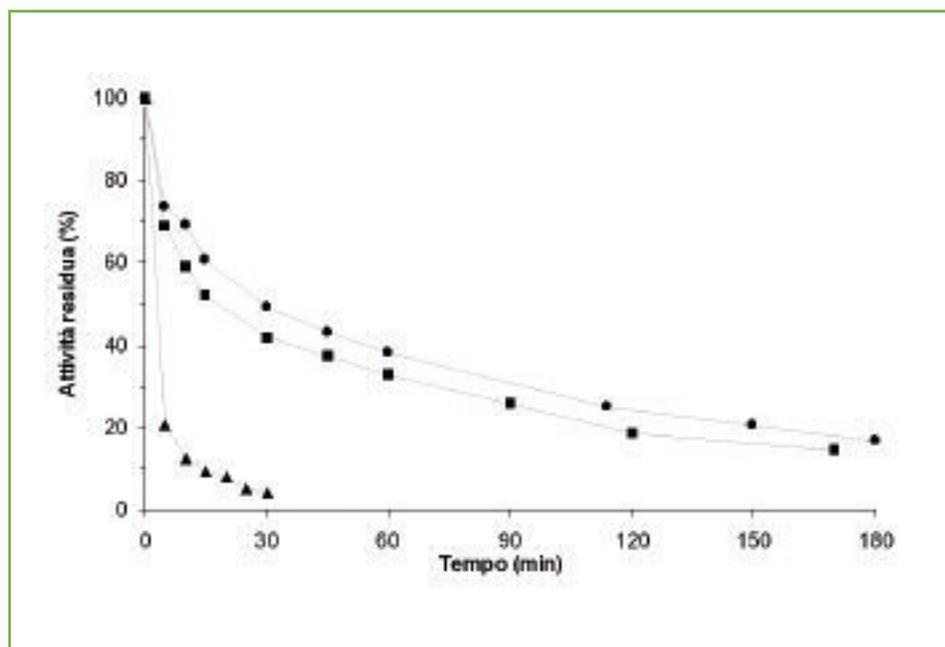


Fig. 4 - Confronto della stabilità della PGA glicosilata, immobilizzata su supporti amminici (●; ■) o su classici supporti epossidici (▲)

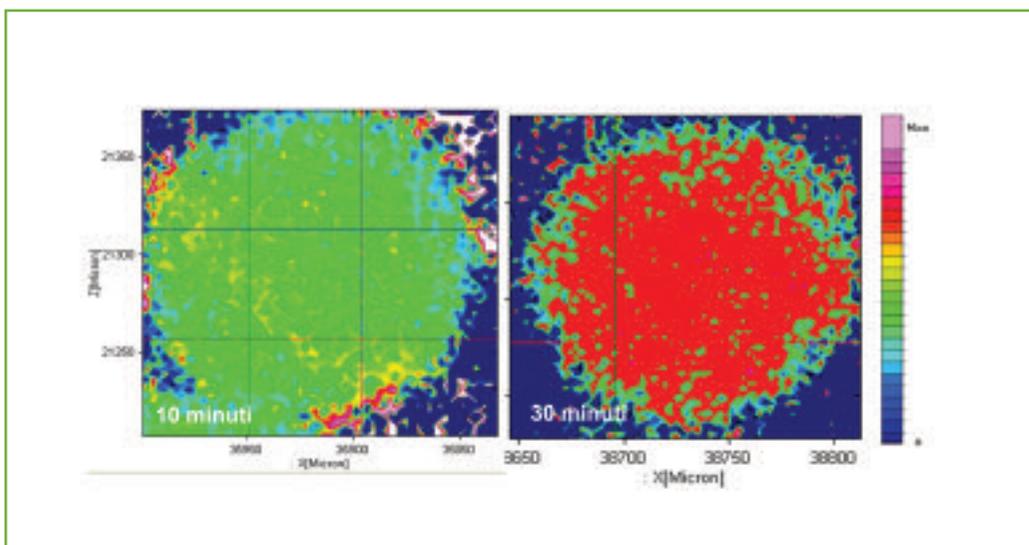


Fig. 5 - Valutazione quantitativa della diffusione nel tempo (10' e 30') entro una matrice polimerica di un substrato contenente l'acido 3-nitropropionico come gruppo cromoforico. Il colore fornisce un'indicazione quantitativa della concentrazione del reattivo secondo la scala cromatica a fianco

idrofobica/idrofila del supporto di immobilizzazione può condizionare sensibilmente le cinetiche di reazione ed in alcuni casi addirittura la termodinamica del processo enzimatico. Ad esempio, nel caso delle lipasi che operano in ambiente organico su substrati idrofobici, i fenomeni di partizione e di solvatazione risultano cruciali, e modificano ampiamente l'attività espressa della lipasi immobilizzata, in funzione del mezzo di reazione e del substrato impiegati.

capacità del supporto di legare l'acqua presente nel sistema andrà quindi ad influire sul valore dell'attività dell'acqua (a_w), il parametro termodinamico che descrive la distribuzione dell'acqua tra le diverse fasi del sistema, e di conseguenza anche il grado di idratazione degli enzimi. Pertanto, l'ottimizzazione di un sistema impiegante biocatalizzatori immobilizzati deve tener conto dell'effetto del supporto di immobilizzazione mediante misura e controllo delle variazioni di a_w nei sistemi di reazione.

Il supporto per l'immobilizzazione dell'enzima inoltre deve prevenire l'adsorbimento dei substrati o dei prodotti di reazione che potrebbero condurre all'aggregazione delle particelle e alla riduzione dei processi diffusivi. Questo problema è riscontrabile con molte lipasi immobilizzate su silicati. Un ultimo commento spetta alla distribuzione dell'acqua all'interno di sistemi biocatalitici in solventi organici. L'acqua ha ruoli molteplici ed influenza sensibilmente sia la termodinamica della reazione che l'attività degli enzimi. La

Bibliografia

- [1] P.J. Goodford, *J. Med. Chem.*, 1985, **28**, 849.
- [2] L. Veum, U. Hanefeld, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, **15**, 3707.
- [3] L. Veum et al., *Adv. Synth. Catal.*, 2005, **347**, 1015.
- [4] G.P. Spiro, *Glycobiology*, 2002, **12**, 43.
- [5] R. Torres et al., *Biotechnol. Prog.*, 2003, **19**, 1056.
- [6] R. B. Trimble et al., *J. Biol. Chem.*, 1991, **34**, 22807.
- [7] M. Nomura et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 2453.

Enzymes Immobilization. Industrial Biocatalysts Optimization

Enzymes usable in industry are often hampered by lack of long-term stability under process conditions, and also by difficulties in recovery and recycling. These problems can be overcome by immobilizing the enzymes on solid supports, so that the biocatalysts are used as insoluble particles. Most often, immobilization strategies are developed through "trial and error" approaches, which results quite time and resources consuming. Recent trends in enzyme immobilization make use of the increasing knowledge of enzyme structure and mechanism. Information derived from protein sequences, 3D-structures, and reaction mechanism can be combined with data on physio/chemical properties of carriers (functional groups, hydrophobicity, etc.) to produce ad hoc immobilization strategies. On this respect, several computational methods can be profitably used for analyzing information and for optimizing the efficiency of the biocatalysts in defined productive processes.