



## LACCASI: ENZIMI DALLE MILLE RISORSE

**Le laccasi, sono enzimi che catalizzano l'ossidazione dei substrati aromatici attraverso la riduzione dell'ossigeno molecolare e formazione di acqua come unico sottoprodotto. L'interesse per le reazioni mediate dalle laccasi risiede nella loro capacità di operare in condizioni blande ed ecocompatibili. Per questi motivi, tali reazioni sono degli strumenti preziosi per la chimica verde con svariate applicazioni in campo sintetico ed industriale.**

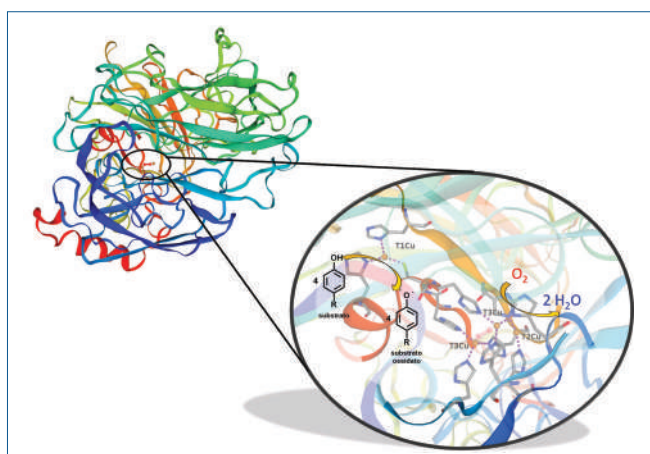


Fig. 1 - Struttura 3D della laccasi da *Trametes versicolor* (Uniprot Q12717) e schema del processo ossidativo del fenolo all'interno del sito catalitico

### Introduzione

Le laccasi (benzenediolo: ossigeno ossidoreduttasi, EC 1.10.3.2) sono un gruppo di enzimi in grado di ossidare una vasta tipologia di molecole e in grado di esplicare l'azione catalitica senza la presenza di cofattori. La prima laccasi fu isolata nel 1883 in *Rhus vernicifera* dall'albero della lacca giapponese *Toxicodendron vernicifluum* e, da allora, le laccasi sono state identificate in diverse specie di piante superiori. Le fonti principali di laccasi sono i funghi che le impiegano per la degradazione ossidativa della lignina, gli insetti e più di 20 specie batteriche. Più in dettaglio, le laccasi ossidano substrati aromatici, principalmente in *orto* e in *para*-difenolici, amminofenoli, polifenoli, poliammine, arilammine e alcuni sali inorganici, attraverso la riduzione dell'os-

sigeno molecolare in acqua, che è l'unico sottoprodotto di reazione [1]. In questo processo ossidativo gli elettroni sono trasferiti dal substrato organico all'ossigeno per mezzo di due siti distinti: nel sito mononucleare T1Cu avviene l'ossidazione mono-elettronica di quattro unità di un dato substrato, gli elettroni migrano al cluster trinucleare T2Cu/T3aCu/T3bCu e sono impiegati per la riduzione dell'ossigeno molecolare a due molecole di acqua (Fig. 1). Il tipo di ligando assiale, la sfera di coordinazione e l'accessibilità del solvente al T1Cu influenzano il potenziale redox delle varie laccasi. Gli enzimi presenti in batteri, piante e insetti, sono enzimi a basso potenziale redox, ( $E^0 = 340-490$  mV), con un uso che può essere limitato ai substrati fenolici; al contrario, le laccasi fungine possiedono nel sito T1 un potenziale redox più elevato ( $E^0 = 500-800$  mV) e pertanto possono esplicare l'azione catalitica verso una più ampia scelta di substrati. Le laccasi fungine

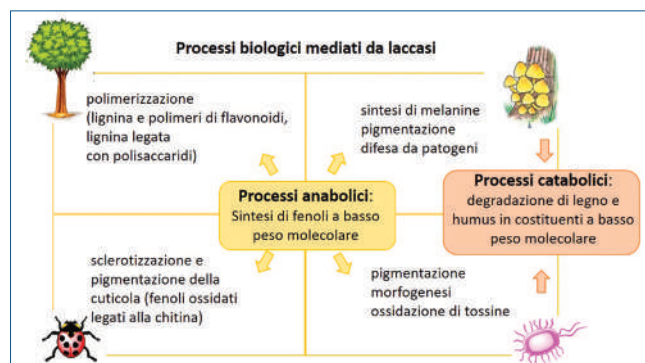


Fig. 2 - Processi biosintetici mediati dalle laccasi. Riproduzione da [2] con il permesso della Royal Society of Chemistry



hanno una stabilità termica inferiore rispetto a quelle batteriche, che sono più attive e più stabili in condizioni estreme come pH elevato, alte temperature e alte concentrazioni di ioni rame e cloruro.

### Reazioni mediate da laccasi: azione catalitica in natura e processi biosintetici

Le laccasi in natura esplicano un'azione catalitica sia in processi anabolici che catabolici (Fig. 2) [2]. Nelle tipiche reazioni anaboliche, i fenoli a basso peso molecolare sono ossidati a intermedi radicalici e/o chinonici, e promuovono la biosintesi di vari dimeri per accoppiamento radicalico, tra cui lignani e composti correlati (neolignani) quando le molecole di partenza sono i fenilpropanoidi (Fig. 3). Questi composti, biosintetizzati per accoppiamento di radicali 8-8' (lignani) o accoppiamento di radicali in cui l'elettrone è localizzato su altre posizioni, 8-5', 5-5' o 8-O-4' (neolignani), presentano un'ampia diversità e complessità strutturale, nonché numerose proprietà biologiche: antiossidante, antibatterica, anti-infiammatoria, antitumorale, neuro- e cardioprotettiva. I dimeri così prodotti contengono ancora funzioni fenoliche, possono formare altri radicali e produrre oligomeri e polimeri mediante accoppiamenti intra/intermolecolari. Lignina, polimeri di flavonoidi, melanine, chinoni legati a proteine cuticolari ecc. sono tipici prodotti polimerici. I processi catabolici mediati dalle laccasi includono invece la depolimerizzazione della lignina/lignocellulosa, la degradazione dell'humus.

Alcuni composti dimerici naturali sono diventati agenti chemioterapici. Esempi includono (Fig. 4):

- l'antitumorale 3',4-di-O-metilcedrusina, che ha ispirato la sintesi di altri agenti antitumorali;
- la podofillotossina, un antimicotico la cui ottimizzazione ha portato al farmaco anticancro etoposide;
- l'ipericina, un pigmento antrachinonico naturale

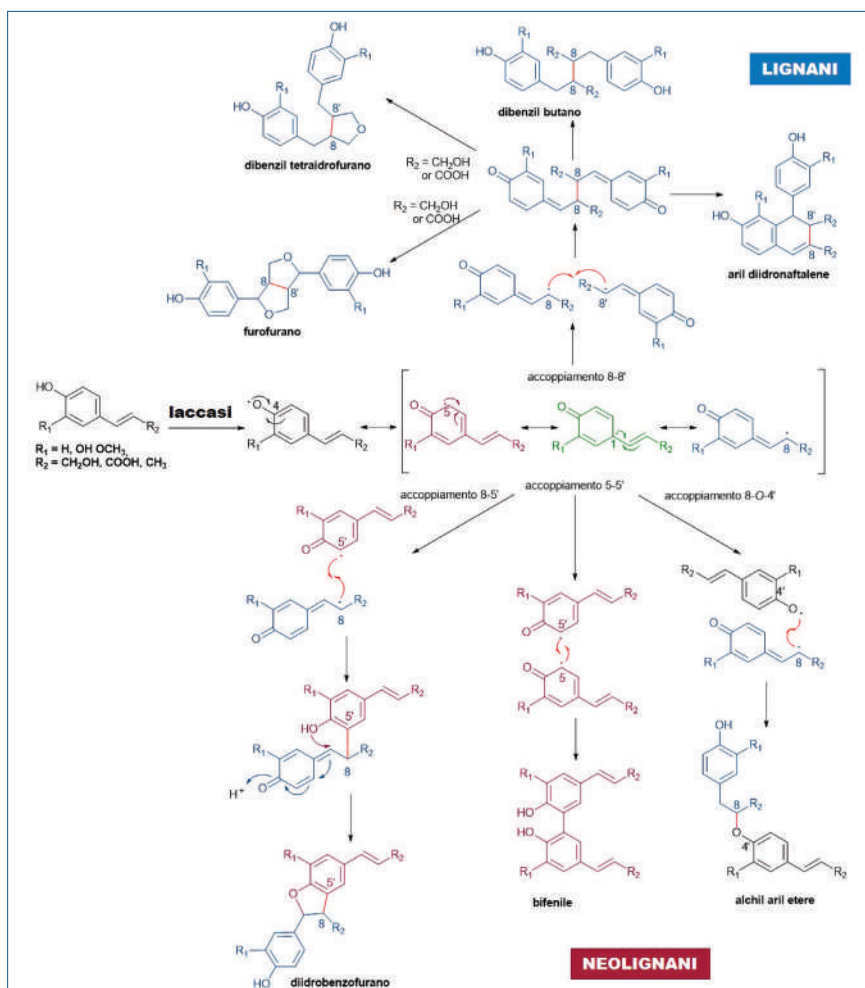


Fig. 3 - Biosintesi di lignani e neolignani per ossidazione e accoppiamento radicalico di fenilpropanoidi. Riproduzione da [2] con il permesso della Royal Society of Chemistry

utilizzato nel trattamento di diversi tipi di cancro e con attività antimicrobica;

- il gossipolo, un potenziale agente terapeutico per il trattamento di tumori resistenti e malattie croniche. Le laccasi si sono rivelate utili biocatalizzatori nella sintesi ecocompatibile di composti bioattivi. La sfida dei chimici organici in tal senso è applicare le stesse reazioni che normalmente avvengono in natura su un più ampio numero di reagenti, nonché aumentare l'attività e la stabilità di questi enzimi. Diversi parametri possono influenzare le prestazioni e la stabilità delle laccasi, tra cui pH, temperatura e solvente; inoltre, a parità di enzima, le diverse condizioni di reazione possono produrre diversi prodotti di reazione. L'intervallo di pH a cui le laccasi svolgono la loro attività varia da 7,0 a 4,5 e può aumentare fino a pH 9 per alcune di esse.

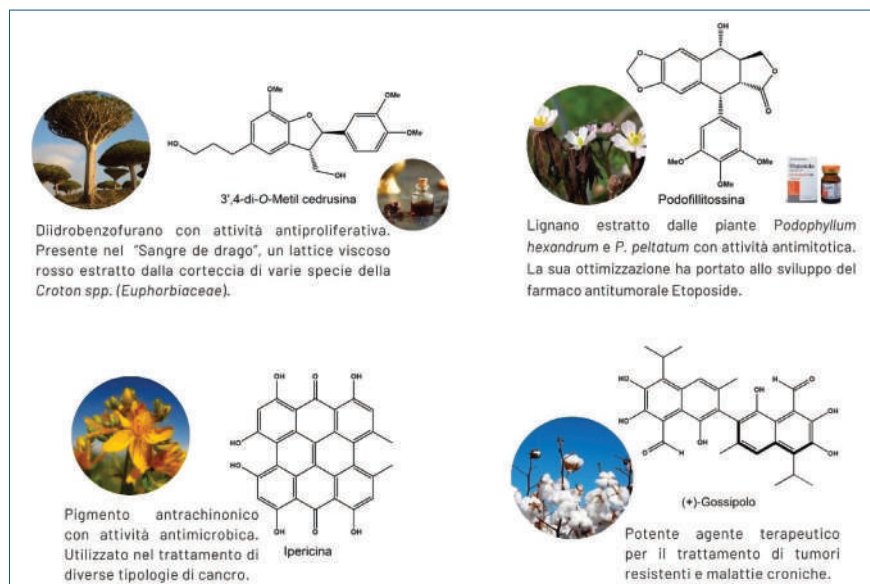


Fig. 4 - Composti naturali ottenuti dall'azione catalitica delle laccasi con attività terapeutica o promettenti attività biologiche

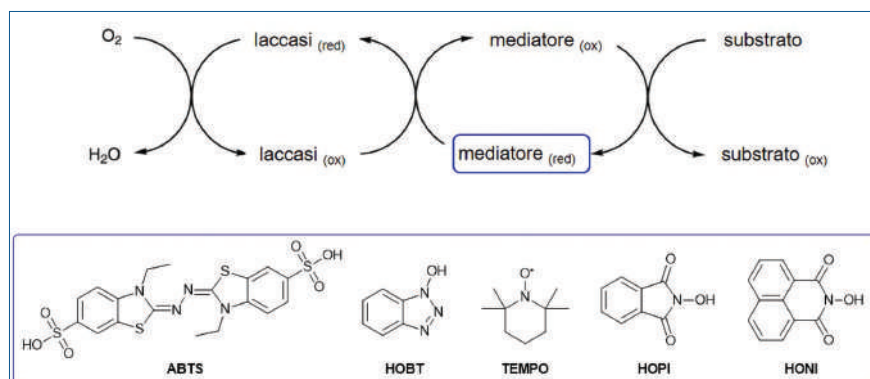


Fig. 5 - Meccanismo redox di laccasi in presenza di mediatori: acido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico) (ABTS), radicale 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinil ossile (TEMPO), 1-idrossibenzotriazolo (HOBT), *N*-idrossifitalimmide (HOPI) e *N*-idrossinaftalimmide (HONI)

Inoltre, la temperatura ottimale varia da 50 °C a 70 °C e poche laccasi sono impiegate a temperature inferiori a 35 °C. Molto spesso queste reazioni possono essere eseguite in presenza di solventi organici, utili per dissolvere substrati idrofobici, senza ridurre significativamente l'attività dell'enzima. In alcuni casi, il solvente può esercitare effetti stabilizzanti su un radicale specifico, promuovendo così la formazione di un prodotto con alta selettività. I liquidi ionici rappresentano un'alternativa ai comuni solventi organici molecolari, avendo vantaggi come idrofobicità e miscibilità con l'acqua modulabili, alta solubilità degli enzimi, tensione di vapore trascurabile e buona stabilità termica. La

vera innovazione è rappresentata dall'utilizzo di solventi eutettici naturali (NADES) per le loro caratteristiche "green". In particolare, gli eutettici a base di betaina hanno mostrato le migliori caratteristiche per la stabilità delle laccasi a temperature più elevate, migliorando così l'efficacia dell'enzima.

Molecole organiche che richiedono un  $E^0$  maggiore di quello delle laccasi possono essere ossidate in presenza di mediatori aumentando così la gamma dei substrati modificabili (Fig. 5). Ad esempio, le laccasi ( $E^0 = 440-790$  mV) ossidano l'ABTS ( $E^0 = 690$  mV) generando il catione radicalico ABTS<sup>•+</sup> che si evolve spontaneamente nel dicatione ABTS<sup>2+</sup> ( $E^0 = 1100$  mV). Esso migra dal sito attivo dell'enzima e può estrarre un radicale idrogeno da un substrato ad alto valore di  $E^0$ , ossidandolo. Queste specie sono utilizzate per l'ossidazione di alcoli attivati a chetoni o aldeidi, o per la degradazione industriale della lignina.

Ad oggi, le laccasi sono state sfruttate per diverse trasformazioni chimiche (Fig. 6), incluso l'accoppiamento ossidativo di una vasta gamma di substrati fenolici e diamminici per ottenere composti dimerici. Un approccio alternativo nell'uso delle laccasi nella sintesi fine è la conversione di gruppi fenolici, presenti anche in ormoni steroidei e alcaloidi, in intermedi elettrofili reattivi, tramite formazione di chinoni. Benzimidazoli, benzotiazoli, chinazolinoni, fenazine e fenossazinoni con attività biologica si ottengono mediante reazioni di ciclo-condensazione, addizione di Michael o Diels-Alder in presenza di chinoni generati *in situ* dalle laccasi (Fig. 6) [2-4]. Ad esempio, l'addizione di Michael di ammine primarie in presenza di intermedi chinonici prodotti per azione della laccasi da *Myceliophthora thermophila* e *Trametes* sp. può generare nuovi antibiotici β-lattamici e cefalosporine [4].

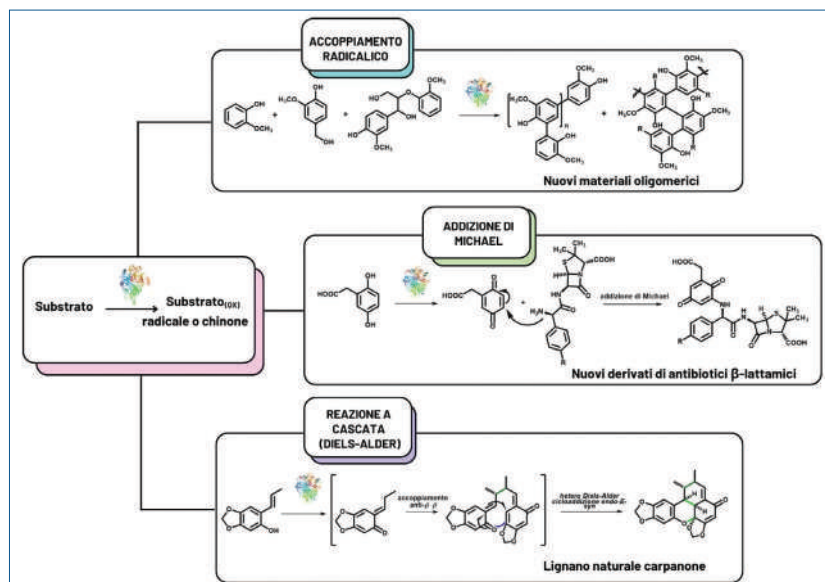


Fig. 6 - Esempi di trasformazioni mediate da laccasi per sintesi biomimetiche di molecole organiche: carpanone [3], nuove penicilline [4] e nuovi materiali oligomerici [5]

Le laccasi mostrano utilizzi differenti che vanno dallo sfruttamento di biomasse per la produzione di biocombustibili alla lavorazione della carta, dall'ottenimento di polimeri biocompatibili all'ottenimento di nuovi prodotti di valore aggiunto a partire dalla lignina, dalla stabilizzazione dei cibi nell'industria alimentare alla produzione di bio-colori nel settore tessile, dal biorisanamento delle acque allo sviluppo di biosensori (Fig. 7) [6].

La lignina è un polimero naturale poco utilizzato a causa della sua struttura complessa, dell'alto peso molecolare, dell'elevata rigidità strutturale e dell'incompatibilità con altri polimeri. Un'economia sostenibile basata su bioraffinerie lignocellulosiche per produrre biocarburanti, bioetanolo di seconda

### Laccasi: biocatalizzatori per uso industriale

Il successo delle laccasi come biocatalizzatori nelle applicazioni industriali è dovuto alla loro grande adattabilità. Il primo enzima industriale è stato sviluppato nel 1996 da Novozyme (DeniLite®).

generazione e composti chimici è cruciale per sostituire l'industria dei combustibili fossili. La lignina ostacola l'accesso ai carboidrati e favorisce l'adsorbimento aspecifico degli enzimi idrolitici durante i processi di conversione della biomassa. Le laccasi

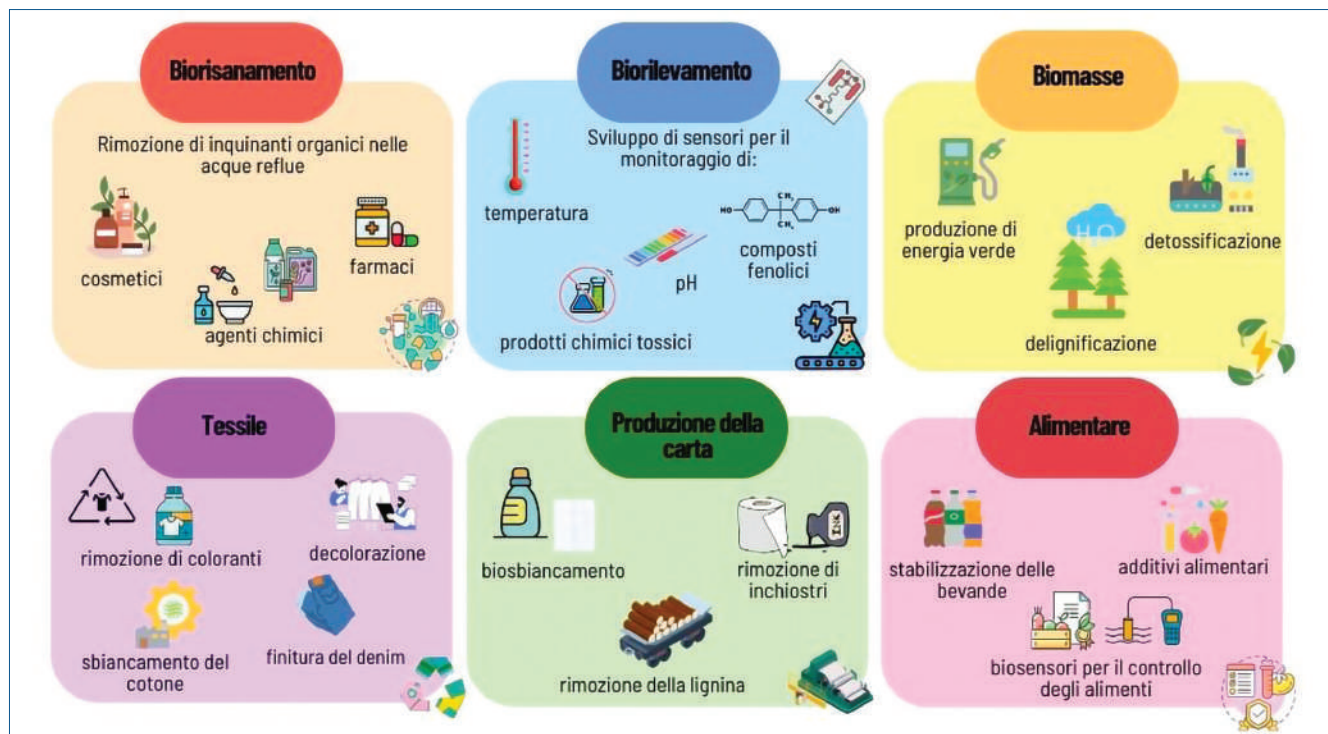


Fig. 7 - Applicazioni industriali delle laccasi

possono modificare o eliminare parzialmente la lignina nella biomassa pretrattata, migliorando l'idrolisi enzimatica dei carboidrati, rendendole uno strumento biotecnologico chiave per sfruttare la biomassa cellulosa per la produzione di biocarburanti.

Gli scarti delle industrie agricole e alimentari spesso contengono composti fenolici, pH basso, alti livelli di COD e BOD, rendendo complesso un trattamento unico con microrganismi. I trattamenti enzimatici, invece, risultano più adatti. Le laccasi sono utilizzate principalmente per trattare acque reflue di frantoi oleari, distillerie, birrifici e per la delignificazione dei residui agroalimentari. Nel processo di lavorazione delle bevande, i trattamenti enzimatici vengono applicati per migliorare o modificare l'aspetto del colore. Nell'industria della birra, l'utilizzo delle laccasi non solo fornisce stabilità, ossidando le proantocianidine naturalmente presenti e responsabili della torbidità, ma aumenta la sua conservazione a seguito della rimozione dell'ossigeno in eccesso. Nel processo di vinificazione, biosensori a base di laccasi sono utilizzati per il controllo del contenuto di polifenoli. Inoltre, questi enzimi sono impiegati nella creazione di una classe speciale di vini nota come "Noble Rot".

Questi biocatalizzatori sono impiegati nell'industria delle tinture tessili con un ruolo duplice: per la biodegradazione dei coloranti sintetici (es. ossidazione enzimatica del colorante indaco) e per la produzione di nuovi prodotti colorati (dal marrone/giallo al blu e rosso) attraverso l'ossidazione dei derivati del benzene con almeno due sostituenti (ad esempio gruppi idrossilici, amminici, metossilici). Nella colorazione dei capelli, le laccasi rappresentano dei bio-ossidanti alternativi ed evitano l'uso di perossido di idrogeno e fenilendiammine, spesso irritanti, allergeniche e cancerogene.

Le laccasi hanno dimostrato un notevole potenziale nel biorisanamento per il trattamento degli effluenti industriali, con la capacità di ossidare efficacemente una varietà di inquinanti organici presenti nelle acque reflue: bisfenolo A e i suoi derivati, bifenili policlorurati, diossine e altri composti fenolici, noti come mutageni e interferenti endocrini. La rimozione di queste sostanze chimiche pericolose avviene tramite dealogenazione mediata da radicali e/o polimerizzazione ossidativa, con la conseguente forma-

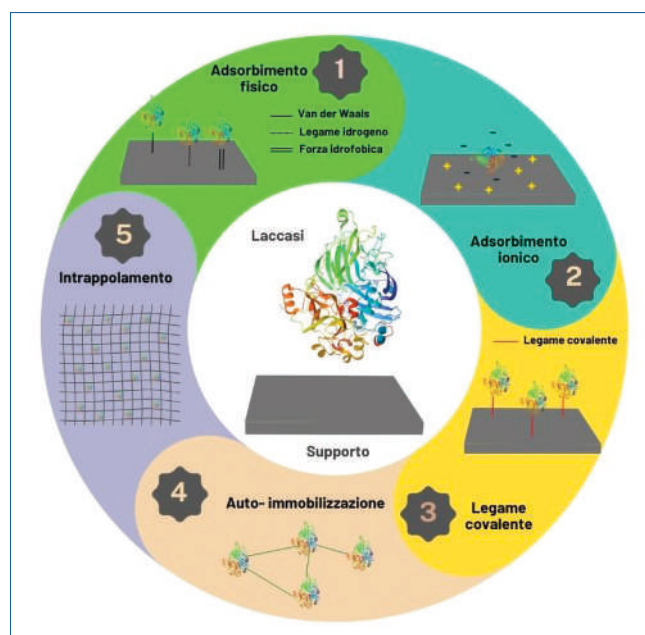


Fig. 8 - Tecniche di immobilizzazione delle laccasi

zione di composti con tossicità e solubilità in acqua notevolmente ridotte e facili da rimuovere. Inoltre, è stato provato che le laccasi degradano vari prodotti farmaceutici, con particolare attività su steroidi e antibiotici.

L'utilizzo delle laccasi si estende anche verso la modifica e/o la reticolazione di materiali polimerici al fine di ottenere materiali con nuove o migliorate proprietà/applicazioni. La lignocellulosa sottoposta a trattamenti con laccasi può fornire nuovi prodotti con stabilità chimica e/o meccanica superiori, nonché biomateriali con attività antimicrobica e antiossidante. L'azione delle laccasi su polisaccaridi (cellulosa, chitina ecc.) è in grado di produrre materiali da funzionalizzare.

Nonostante i numerosi vantaggi associati all'uso delle laccasi, esistono alcune limitazioni dovute all'instabilità enzimatica in diverse condizioni quali pH, forza ionica e temperatura, proteolisi, inattivazione da parte di inibitori, alla difficoltà di separare l'enzima dalla miscela di reazione e al suo riutilizzo. L'immobilizzazione è la chiave per ottimizzare le prestazioni operative delle laccasi nei processi industriali e in particolare nei mezzi non acquosi, in modo da aumentare il potenziale utilizzo dell'enzima, ottenere il suo riutilizzo e incrementarne la stabilità [7]. Uno schema dei più comuni metodi di immobiliz-



zazione è riportato in Fig. 8 e vari articoli riportano le principali applicazioni soprattutto nell'ambito del biorisanamento delle acque [8, 9].

Le ultime ricerche puntano quindi a trasferire il *know-how* di laboratorio ai processi industriali per sviluppare soluzioni di chimica verde. La principale sfida del futuro pertanto è ridurre i costi di produzione delle laccasi per l'utilizzo su larga scala. I recenti progressi nella bioingegneria e immobilizzazione delle laccasi ne migliorano efficienza, stabilità e riciclo, aprendo la strada a nuove applicazioni nei prossimi anni e allo sviluppo di nuove piattaforme biocatalitiche.

#### BIBLIOGRAFIA:

- [1] P. Giardina, V. Faraco *et al.*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, **67**, 369.
- [2] N. Cardullo, V. Muccilli *et al.*, *RSC Chemical Biology*, 2022, **3**, 614.
- [3] M.A. Constantin, J. Conrad *et al.*, *The Journal of Organic Chemistry*, 2012, **77**, 4528.
- [4] A. Mikolasch, K. Manda *et al.*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2012, **59**, 269.
- [5] J. Lim, B. Sana, *et al.* *Chemistry an Asian Journal*, 2018, **13**, 284.
- [6] Y.R. Maghraby, R.M. El-Shabasy *et al.*, *ACS Omega*, 2023, **8**, 5184
- [7] S. Aggarwal, A. Chakravarty *et al.*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, **167**, 962
- [8] W. Zhou, W. Zhang, *et al.*, *Chemical Engineering Journal*, 2021, **403**, 126272.
- [9] Z. Chen, W.D. Oh *et al.*, *Chemosphere*, 2022, **307**, 135824.



SCOPRI DI PIÙ

#### MODULO BASE

Specifiche / Contratti	Accettazione / Lotti Ispettivi	Fogli di Lavoro - Input dati	Automazione Calcoli - SOP Logiche Formule	Controllo S.A.L. Campioni	Verifica / Approvazione / Firma Dig.	Risultati (RdP / CoA)	Log - Audit Trail	Gestione Documenti	Email Integrate
------------------------	--------------------------------	------------------------------	---	---------------------------	--------------------------------------	-----------------------	-------------------	--------------------	-----------------