

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI AGRARIA

**Dipartimento di OrtoFloroArboricoltura e Tecnologie Agroalimentari
Sezione Tecnologie Agroalimentari**

Dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie Alimentari
XXIII Ciclo

ELEONORA ABBATE

**Glicosidasi da *Aspergillus*:
produzione tramite l'impiego di scarti dell'industria agrumaria,
caratterizzazione e immobilizzazione**

Tesi finale

Coordinatore:
Prof. Giovanni SPAGNA

Tutor:
Prof. Giovanni Spagna

TRIENNIO 2007-2010

1. Scopo del lavoro e articolazione della ricerca

1.1 Il pastazzo d'agrumi

Da molti decenni la ricerca scientifica ha rivolto il proprio interesse agli scarti derivanti dai processi di lavorazione dei prodotti delle industrie agro-alimentari. L'interesse verso queste materie è dovuto alla possibilità di minimizzare gli sprechi, di estrarre da questi composti chimici di notevole impatto scientifico, di favorirne il riciclaggio o di abbatterne i costi di smaltimento. Al contrario, non trovando alcuna collocazione sul mercato, esse verrebbero smaltite e/o trattate come materie esauste, incrementando i problemi di inquinamento.

Una forte attenzione, in particolare nelle zone del sud-Italia, è rivolta agli scarti provenienti dalla lavorazione industriale degli agrumi, denominato in gergo "*pastazzo*". Gli agrumi hanno una porzione edibile molto ridotta rispetto ad altri tipi di frutti, cosicché la produzione di derivati è accompagnata dalla formazione di grandi quantità di scarti di lavorazione solidi e liquidi (polpe, scorze, semi, oli essenziali, acque di centrifuga) che pongono alle aziende seri problemi di stoccaggio e smaltimento, aggravati dall'alta suscettibilità alla degradazione microbica. La quantità di pastazzo ottenuta dal processo produzione di succhi e derivati si aggira intorno al 50-60% in peso del prodotto originario. Di tale quantitativo il 70% viene prodotto in Calabria e Sicilia, e viene destinato principalmente al consumo tal quale, in quanto viene utilizzato come alimento per gli animali da reddito, grazie alla facile reperibilità e all'economicità della materia. (*Niutta et al. 2006*).

L'interesse per il pastazzo deriva anche dalla possibilità di estrarre da esso una notevole varietà di composti ad alto impatto chimico-farmaceutico. La composizione del pastazzo è direttamente legata alla composizione chimica degli agrumi. Quest'ultima è influenzata a sua volta da diversi fattori, come condizioni di crescita, grado di maturazione, cultivar e clima. Gli agrumi contengono (1-2 g/kg) lipidi (oleico, linoleico, linolenico, palmitico), acidi organici (citrico e malico), carboidrati insolubili (cellulosa, pectina), enzimi (pectinesterasi, fosfatasi, per ossidasi), flavanoni glicosidici (esperidina, naringina), composti amari (limonene), costituenti volatili (aldeidi, chetoni, alcol), vitamine (acido ascorbico, vitamina B), minerali, basse concentrazioni di amminoacidi e oli essenziali (*Bampidis 2006*).

In questo studio ci proponiamo di utilizzare il pastazzo come fonte energetica per la crescita di microrganismi, grazie al loro alto contenuto di carbonio e di altri nutrienti, e

come induttore specifico per la sintesi di glicosidasi, grazie alla presenza di flavanoni glicosidici.

1.2 Citrus flavonoids: esperidina e naringina

I flavonoidi sono la classe più importante di metaboliti secondari presenti negli agrumi, e hanno un ruolo significativo in quasi tutti gli aspetti della produzione e della lavorazione degli agrumi. Questi composti polifenolici sono particolarmente abbondanti in: frutta, vegetali, olio d'oliva, tè e vino rosso. Sono conosciuti per gli aspetti benefici che hanno sulla salute dell'uomo, soprattutto come antiossidanti e scavenger di radicali liberi. Sono caratterizzati da una struttura planare che deriva dal fenil- γ -benzopirone, tre anelli di cui due aromatici e un eterociclo ossigenato (*Manthey et al. 2002*).

I flavonoidi presenti in quantità maggiore negli agrumi sono l'esperidina (esperetina-7-ramnoglucoide; $C_{28}H_{32}O_{14}$) e la naringina (naringenina-7-ramnoglucoide; $C_{27}H_{31}O_{14}$), che appartengono alla sottoclasse dei flavanoni, maggiormente presenti nelle parti non edibili, ovvero buccia e albedo. L'esperidina è costituita dall'aglicone esperitina e dal diglicoside rutinosio [ramnosil(α 1 \rightarrow 6)glucosio], la naringina dall'aglicone naringenina e dal diglicoside neoesperidosio [ramnosil(α 1 \rightarrow 2)glucosio]. La naringina conferisce il caratteristico sapore amaro al pompelmo, mentre l'esperidina è il corrispettivo non amaro della naringina ed essendo poco solubile, è responsabile della torbidità dei succhi di agrumi, principalmente di quelli d'arancia.

L'esperidina, in sinergia con la diosmina, viene utilizzata per i trattamenti di insufficienza capillare, in quanto aumenta l'efficienza del collagene e del tessuto connettivo. La naringina ha azione epatoprotettiva, antivirale e miorilassante. Entrambi hanno proprietà antinfiammatorie e antiossidanti. Quando vengono ingeriti, a livello intestinale, vengono idrolizzate ad opera degli enzimi α -L-ramnosidasi, eso- β -glucosidasi, endo- β -glucosidasi e/o β -glucuronosidasi prodotti dalla microflora batterica intestinale, perdono le molecole zuccherine (ramnosio e glucosio) e si trasformano nei loro corrispettivi agliconi, esperitina nel caso dell'esperidina e naringenina in quello della naringina, e in tal modo vengono assorbiti e metabolizzati (*Manach et al. 2005; Kim et al. 1998*).

È stato riscontrato che l'esperitina-7-glucoside ha una maggiore biodisponibilità rispetto all'esperidina stessa, grazie ad un maggiore assorbimento a livello intestinale e alla maggiore solubilità in acqua (*Manthey et al; 2002*).

Dai flavonoidi si possono ottenere, per apertura dell'anello centrale e successiva riduzione, i diidrocalconi. Ad esempio dalla naringina si ottiene la naringina diidrocalcone, un edulcorante artificiale senza calorie con un potere dolcificante 1000 volte più alto della saccarina. Un potenziale diidrocalcone si può ottenere dall'esperetina-7-glucoside.

1.3 Ruolo delle glicosidasi: α -L-rmanosidasi e β -D-glucosidasi

L'enzima α -L-ramnosidasi (Rha, EC 3.2.1.40) agisce sul legame glicosidico del ramnosio [legame $\alpha(1\rightarrow6)$] nell'esperidina idrolizzandola in esperitina-7-glucoside e nella naringina [legame $\alpha(1\rightarrow2)$] idrolizzandola in prunina. L'enzima β -D-glucosidasi (bG, EC. 3.2.1.21) agisce in successione idrolizzando gli agliconi parziali dando i rispettivi agliconi, esperitina nel caso dell'esperidina e naringenina in quello della naringina. Il loro meccanismo d'azione è illustrato in figura **1.1** e in figura **1.2**.

Scopo del lavoro è la produzione e la caratterizzazione di α -L-ramnosidasi e di β -D-glucosidasi da parte di funghi del genere *Aspergillus*: *Aspergillus aculeatus* (*A. aculeatus*), *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*), *Aspergillus niger* (*A. niger*) e *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) e utilizzando come induttore il pastazzo. Tra tali m.o. sarà selezionato il ceppo migliore per la produzione di α -L-ramnosidasi allo scopo di caratterizzarla, attraverso parametri chimico fisici e cinetici: V_{max} e K_m , pH ottimale, temperatura ottimale, inibizioni da zuccheri e altre sostanze che caratterizzano i succhi. La caratterizzazione verrà effettuata anche per la β -D-glucosidasi. Essendo quest'ultima un'attività collaterale dell' α -L-ramnosidasi ci proponiamo di mettere a punto un metodo di purificazione per separare le due attività. Un'ulteriore obiettivo di questo lavoro è l'immobilizzazione di tali enzimi.

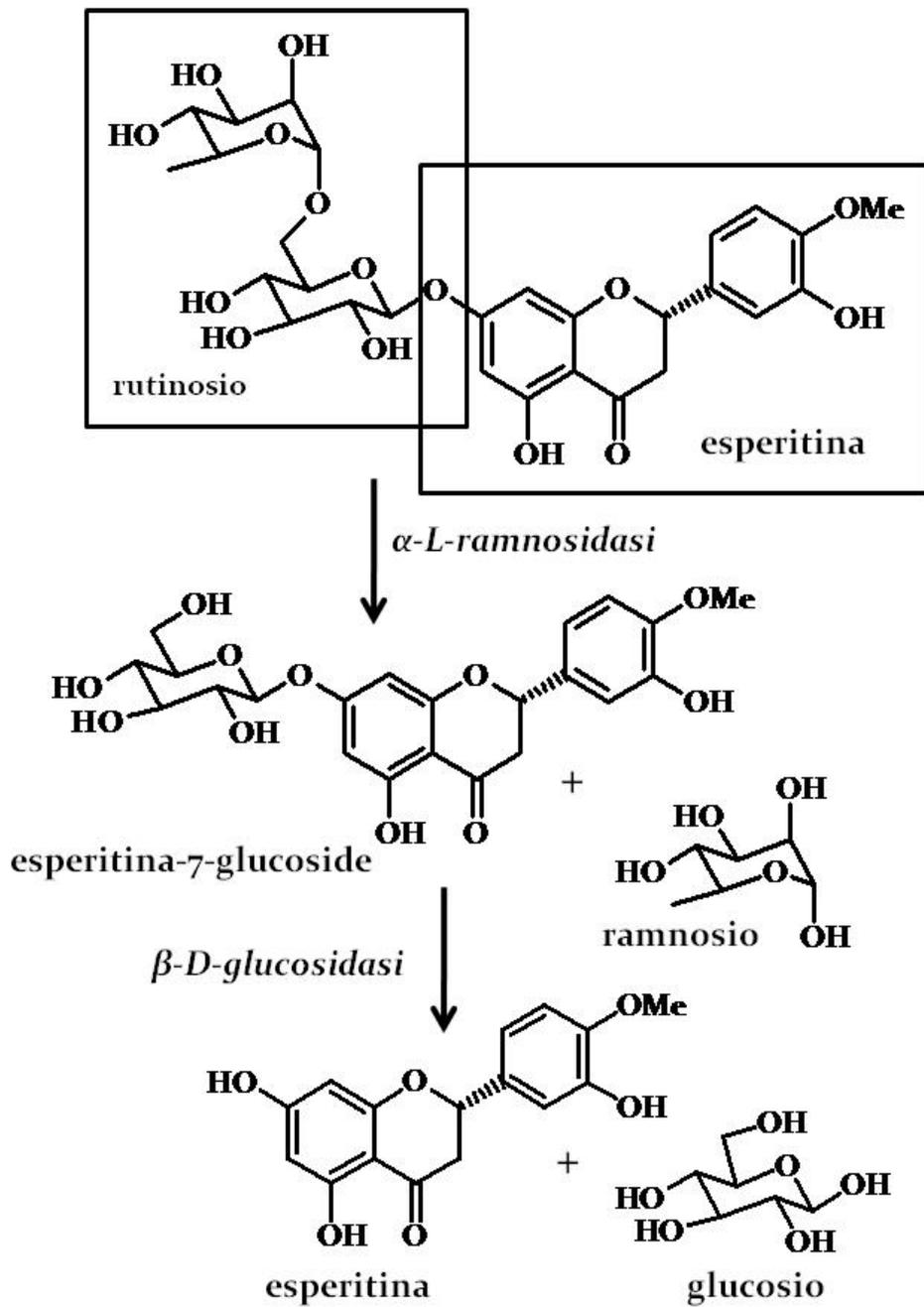


Figura 1.1 Meccanismo d'azione dell' α -L-ramnosidasi e della β -D-glucosidasi sull'esperidina

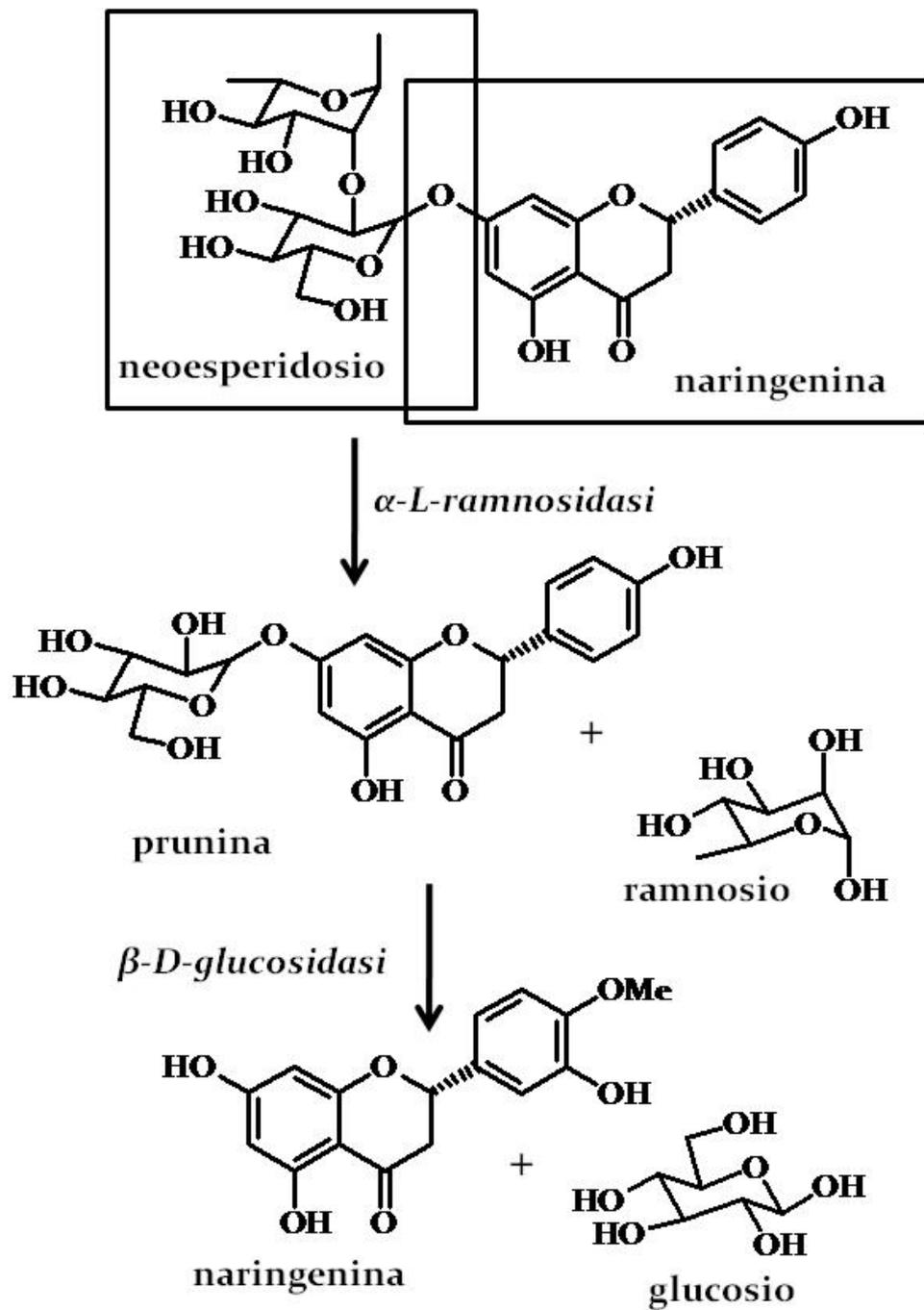
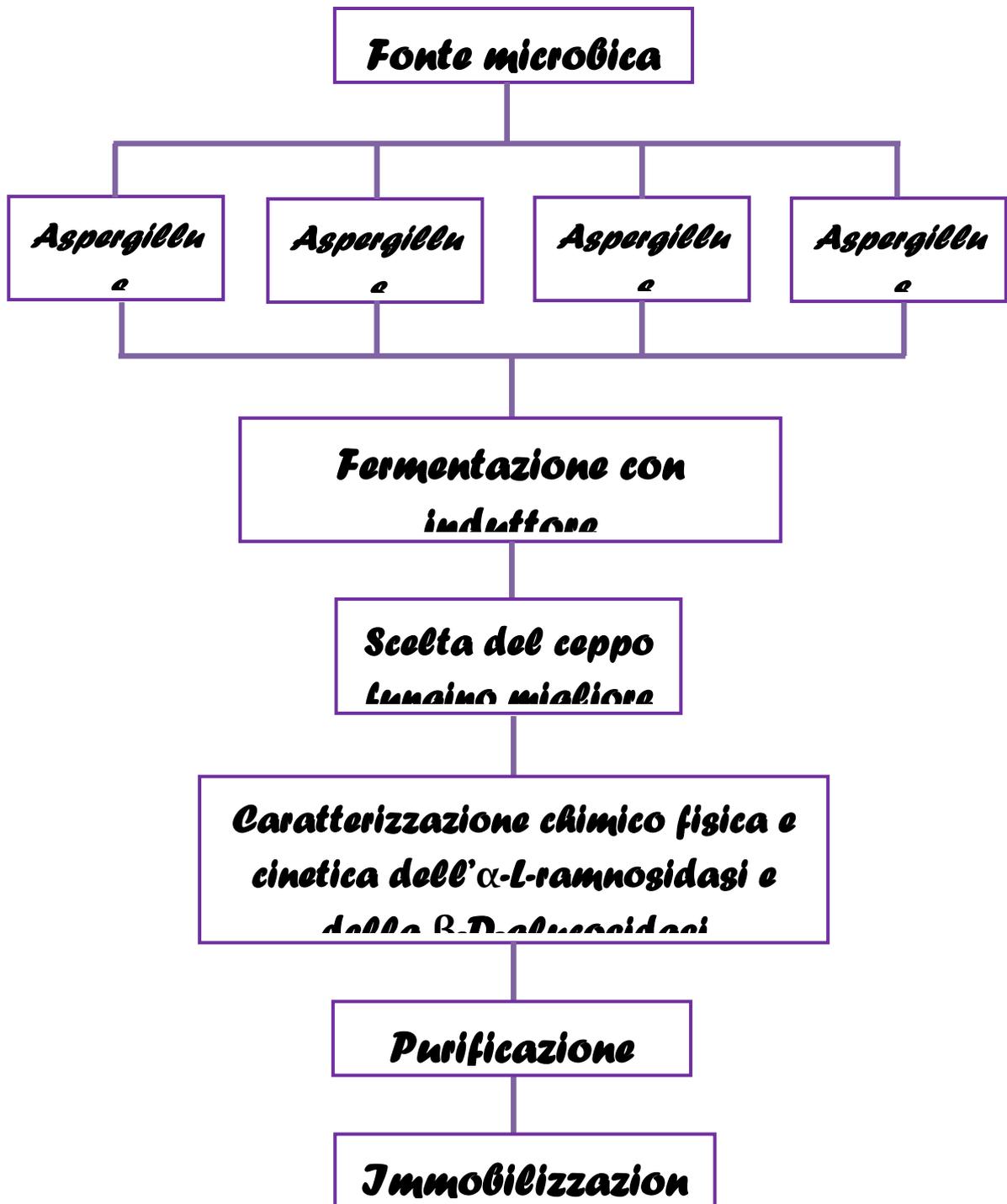


Figura 1.2 Meccanismo d'azione dell' α -L-ramnosidasi e della β -D-glucosidasi sulla naringina



2. La biotecnologia

2.1 Cos'è la biotecnologia?

La nascita e lo sviluppo delle biotecnologie è una delle espressioni più significative del rapporto tra scienza e tecnica.

Il termine biotecnologia è un neologismo derivato dalla coniugazione di due termini: **biologia** e **tecnologia**. La biologia è lo studio degli esseri viventi e delle leggi che li governano. Ne fanno parte numerose scienze, come botanica, zoologia, anatomia, genetica. La tecnologia è lo studio dei processi e delle apparecchiature atti alla produzione di beni e servizi in una particolare area o industria. La biotecnologia quindi, non è altro che l'applicazione tecnologica di metodi derivati dalla conoscenza delle scienze biologiche per l'ottenimento di beni e servizi. Parliamo di produzione di particolari beni, ottenuti mediante l'impiego di organismi (microrganismi, piante, animali) e/o loro prodotti (es. enzimi, ormoni) risultanti anche dall'applicazione di tecniche di modificazione genetica, e di fornitura di nuovi servizi, per es. diagnostica, trapianto, terapia, prevenzione, alimentazione sana, grazie alla migliore comprensione della fisiologia, della genetica e della biologia molecolare.

Secondo la EFB (European Federation of Biotechnology) la definizione di biotecnologia si può così riassumere:

“È l'integrazione delle scienze naturali, di organismi, cellule, loro parti o analoghi molecolari, nei processi industriali per la produzione di beni e di servizi”

Possiamo genericamente suddividere le biotecnologie in base al loro campo di applicazione:

Red biotechnology (*Biotecnologia rossa*) Riferito ai processi biomedici e farmaceutici. Si concentra sull'individuazione di organismi in grado di sintetizzare farmaci o antibiotici e sullo sviluppo di tecnologie di ingegneria genetica per la cura di patologie.

White biotechnology, conosciuta anche con il nome di **grey biotechnology** (*Biotecnologia bianca o grigia*). È la branca che si occupa dei processi biotecnologici di interesse industriale, come per esempio la produzione di sostanze chimiche utilizzando microrganismi. Le risorse consumate dai processi industriali di tipo biotecnologico sono

notevolmente minori di quelli tradizionali; rappresenta infatti un settore in notevole espansione.

Green biotechnology (*Biotechnologia verde*). Si occupa dei processi agricoli. Tra le applicazioni, troviamo la modificazione di organismi per renderli in grado di crescere in determinate condizioni ambientali o nutrizionali, al fine di produrre soluzioni agricole aventi un impatto ambientale minore rispetto ai processi agricoli classici. Si parla, in questo caso, dei cosiddetti OGM (Organismi Geneticamente Modificati).

Una suddivisione più grossolana divide la biotecnologia moderna da quella tradizionale. Entrambi usano gli organismi per aiutare l'uomo, solo che la prima maneggia i geni degli organismi e li inserisce in altri organismi per esprimere la caratteristica voluta, mentre la seconda utilizza i processi degli organismi tal quali, come per esempio la fermentazione. I microrganismi sono dei veri e propri "mini-operai", la loro aggiunta diretta permette di sfruttare il metabolismo cellulare alla base di molti processi fermentativi di grande importanza.

2.2 I processi fermentativi

I processi fermentativi possono essere considerati le biotecnologie **tradizionali** per eccellenza, in quanto questa classe di processi naturali è stata utilizzata fin dall'antichità per le prime forme di tecnologie alimentari, quali la panificazione e la vinificazione. In termini prettamente biochimici, la fermentazione è quel processo anaerobico di demolizione catabolica dei carboidrati, o più in generale di composti organici, operata dai microrganismi per produrre energia.

Più in generale, nella microbiologia industriale, con fermentazione si intende qualsiasi processo che implichi la **coltura di un determinato microrganismo**, sia tale processo aerobico, anaerobico o microaerofilico.

I processi fermentativi, basati sulle attività dei microrganismi, consentono di ottenere un'ampia gamma di prodotti.

Il processo fermentativo è costituito fundamentalmente da due step:

- ✚ Step di reazione (o upstream): comprende la fase di fermentazione o biotrasformazione.
- ✚ Step di isolamento del prodotto (o downstream): comprende tutte le fasi successive alla fermentazione.

In un processo fermentativo, per la sintesi del prodotto desiderato, è necessario tener conto delle esigenze nutrizionali del microrganismo; risulta quindi importante impiegare un terreno di coltura con la formulazione idonea alle sue esigenze nutrizionali necessarie per lo sviluppo del microrganismo stesso e per l'ottenimento del prodotto desiderato (*metabolita*). I terreni di coltura devono contenere dei nutriliti come fonti di carbonio, di azoto, sali minerali, vitamine, fattori di crescita e precursori (induttori).

Un'importante classe di composti ottenibili dai processi fermentativi sono gli enzimi che oggi sono largamente utilizzati a largo spettro nelle biotecnologie, e in particolare nel campo alimentare.

2.3 *Gli enzimi e le biotecnologie*

Le strategie biotecnologiche, in campo industriale, hanno avuto un maggior sviluppo nel settore alimentare. L'utilizzo degli enzimi permette di rinnovare profondamente le tecnologie, migliorare la qualità dei prodotti tradizionali e consentire lo sviluppo di nuove tipologie di processi industriali.

L'uso degli enzimi nel settore alimentare risale al 2000 a.C. quando egiziani e sumeri svilupparono la tecnica di fermentazione per produrre birra, pane e formaggio. Grazie all'avvento delle biotecnologie è stato possibile un utilizzo più raffinato nel campo della trasformazione degli alimenti, grazie anche alla loro capacità di potenziare le caratteristiche nutrizionali e sensoriali.

Le matrici microbiologiche fungine sono le più utilizzate in diversi settori a livello industriale. Nel mercato agroalimentare è però necessario utilizzare enzimi provenienti da funghi definiti GRAS (Generally Recognized As Safe), ovvero microrganismi innocui per il consumatore e basso impatto ambientale.

2.4 Gli enzimi: caratteristiche generali

2.4.1 La struttura degli enzimi

Gli enzimi sono molecole proteiche che hanno il compito di catalizzare praticamente tutte le reazioni chimiche che avvengono negli organismi. Sono generalmente proteine globulari che in soluzione assumono approssimativamente una conformazione sferica. Il loro peso molecolare può variare da 10.000 a milioni di Dalton. Nei casi più semplici la molecola enzimatica è formata da una singola catena polipeptidica contenente un centinaio di residui amino acidici. In quelli più complessi, più catene polipeptidiche sono aggregate tra loro. Gli enzimi, nelle loro reazioni, si combinano con il substrato (S) e ne abbassano l'energia di attivazione, non spostano l'equilibrio della reazione, ma aumentano la velocità con cui l'equilibrio viene raggiunto, essi non subiscono modificazioni permanenti durante la reazione e rimangono quindi disponibili per catalizzare una nuova reazione.

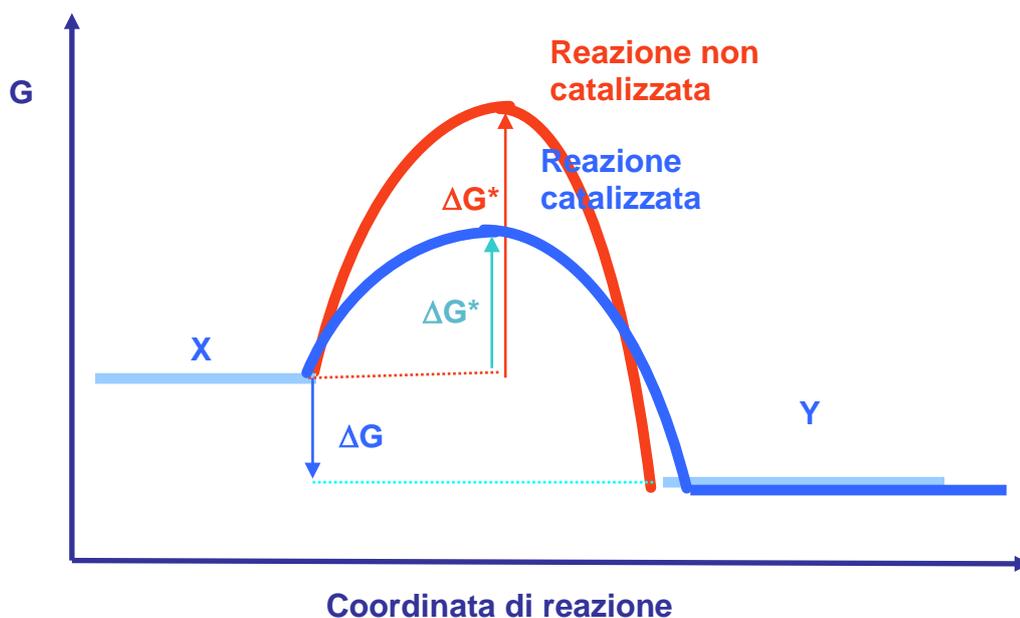
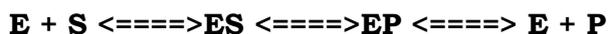


Figura 2.1 - Andamento di una reazione in presenza e in assenza di catalizzatore.

Gli enzimi svolgono il loro ruolo con modalità differenti da reazione a reazione, ma in tutti i casi la catalisi procede attraverso la formazione di complessi tra l'enzima e i

reagenti. La più semplice reazione catalizzata da un enzima può essere così rappresentata da:



L'enzima si combina con il substrato (S), per formare un complesso enzima-substrato (ES), che è poi trasformato in EP. Quest'ultimo si scinde in prodotto (P) ed enzima libero E, che è nuovamente disponibile per reagire con un'altra molecola di S. Il processo può avvenire in maniera estremamente rapida: in molti casi una sola molecola di enzima è in grado di trasformare in 1 secondo migliaia di molecole di substrato in prodotto. La velocità di una reazione catalizzata da un enzima può essere fino a 10^{14} volte superiore alla velocità della stessa reazione non catalizzata.

2.4.2 La classificazione degli enzimi

Tradizionalmente il nome di un enzima era assegnato liberamente dal suo scopritore. Oggi l'International Union of Biochemists (I.U.B) raggruppa gli oltre 1500 enzimi noti in sei classi funzionali:

- 1. OSSIDOREDUTTASI:** catalizzano reazioni di ossidoriduzione;
- 2. TRASFERASI:** catalizzano reazioni di trasferimento di gruppi funzionali da una molecola all'altra;
- 3. IDROLASI:** catalizzano reazioni di idrolisi;
- 4. LIASI:** catalizzano reazioni di addizione a doppi legami;
- 5. ISOMERASI:** catalizzano reazioni di isomerizzazione, trasformazione di una molecola nel suo isomero;
- 6. LIGASI:** (note come sintetasi) catalizzano reazioni di formazione di nuovi legami tra due molecole con utilizzo di ATP (rottura dell'ATP in AMP e pirofosfato o ADP e P_i).

Ciascuna classe funzionale comprende numerose sottoclassi, a loro volta suddivise in sotto-sottoclassi. Ogni enzima è identificato da quattro numeri, i primi tre corrispondenti alla classe, sottoclasse e sotto-sottoclasse; il quarto è caratteristico di ogni singolo enzima all'interno della sotto-sottoclasse.

2.4.3 Il complesso enzima-substrato

L'idea che il meccanismo chimico della catalisi enzimatica comprenda la formazione di un complesso enzima-substrato fu suggerito agli inizi del secolo per spiegare il comportamento cinetico dell'invertasi. La prova diretta dell'esistenza di un simile complesso si è potuta avere solo con l'introduzione di tecniche spettroscopiche.

2.4.4 Il sito attivo e il modello della chiave-serratura

La maggior parte delle reazioni enzimatiche utilizza substrati che sono di piccole dimensioni se comparati alla molecola enzimatica. Di conseguenza solo una piccola parte della proteina enzimatica si trova a diretto contatto con la molecola del substrato a formare il complesso ES. Le porzioni di enzima a contatto con il substrato che giocano un ruolo diretto nel processo catalitico costituiscono il cosiddetto sito attivo (o catalitico). Il resto della proteina enzimatica fornisce una specie di scheletro strutturale che garantisce il mantenimento dei componenti del sito attivo nella conformazione tridimensionale necessaria ad una efficiente e specifica catalisi.

Tutti gli enzimi presentano il fenomeno della specificità di substrato. Ai livelli più elevati di specificità, gli enzimi non solo sono in grado di discriminare in base all'identità chimica del substrato, ma anche sulla base della sua configurazione geometrica e stereochimica.

Il concetto stesso di specificità richiede che l'enzima e il substrato si adattino l'un l'altro. Nel 1894 Fischer propose la sua "ipotesi della serratura e della chiave" (lock and key hypothesis) implicante una complementarità tra substrato ed enzima legata a rigide conformazioni molecolari. Per quanto questa ipotesi sia in grado di spiegare le interazioni enzima substrato per un gran numero di enzimi, diviene difficilmente sostenibile quando si considera che composti chimicamente molto simili al substrato ma che posseggono gruppi meno voluminosi spesso non reagiscono con l'enzima, sebbene dovrebbero facilmente adattarsi al sito attivo.

2.5 Le idrolasi

Gli enzimi idrolitici catalizzano reazioni di idrolisi di diversi tipi di legame: estere, acetale (glicosidico), ammidico (peptidico), e possono essere distinti in diverse sottoclassi:

enzimi pectolitici: ad azione deesterificante e depolimerizzante; appartengono al primo gruppo le *pectinesterasi* che agiscono sulle pectine, fanno parte del secondo le *polimetilgalatturonasi* e le *pectinliasi* che agiscono sulle pectine, nonché le *poligalatturonasi* e le *pectatoliasi* che agiscono sull'acido pectico.

enzimi proteolitici: fra questi si annoverano le *carbossipeptidasi* e le *amminopeptidasi*, che attaccano gli amminoacidi terminali di una proteina, le *proteasi* (acide e neutre) che invece scindono i legami proteici interni e le dipeptidasi che idrolizzano i peptidi.

enzimi glicosidasi: di cui fanno parte, fra gli altri, la β -D-*glucopiranosidasi* (β G), L' α -L-*ramnopiranosidasi* (Rha). Essi idrolizzano in maniera specifica i terpen-glicosidi liberando, attraverso un meccanismo sequenziale, i terpenoli legati ai residui glicosidici in modo selettivo, senza provocare modificazioni strutturali e di conseguenza sono in grado di sviluppare un aroma più naturale (Di Stefano, 1982).

2.6 Le glicosidasi di origine fungina

Le glicosidasi sono delle glicoproteine che appartengono alla classe principale delle idrolasi e operano la scissione idrolitica dei vari derivati glucosidici.

Sono distribuiti nei tre maggiori regni: Archebatteri, Eubatteri ed Eucarioti. In particolare, ceppi produttori si riscontrano sia tra i batteri e gli attinomiceti, che tra gli Eucarioti, in particolare tra gli eucomiceti unicellulari (Lieviti) e multicellulari (Muffe).

Industrialmente vengono utilizzati una ventina di ceppi appartenenti a poche specie soprattutto dei generi *Aspergillus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*. Nella maggior parte dei casi sono prodotti enzimi esocellulari di tipo idrolitico, ad attività depolimerizzante.

Diverse sono le motivazioni che favoriscono il privilegiare i microrganismi per la produzione di questi enzimi:

- ✓ la possibilità di ottenere le desiderate attività enzimatiche in condizioni controllate, impiegando substrati e tecnologie a basso costo;
- ✓ la costanza delle caratteristiche delle preparazioni enzimatiche ottenute e quindi la ripetibilità del processo di fermentazione;
- ✓ l'ampio numero di microrganismi che possono produrre enzimi differenti sia per il tipo di attività posseduta, sia per le diverse condizioni operative richieste (pH e temperature ottimali di attività, grado di stabilità in funzione del pH e delle temperatura di conservazione e del processo, inibitori, attivatori, etc.);
- ✓ Ottenimento delle preparazioni enzimatiche mediante procedure relativamente semplici. Buona parte degli enzimi sono infatti di tipo esocellulare e non necessitano quindi ulteriori processi di purificazione, anche se talora rimane il problema delle attività enzimatiche collaterali che possono accompagnare quelle principali e risultare deleterie, relativamente al processo in cui trova utilizzazione l'attività principale.

2.7 α -L-ramnosidasi

2.7.1 Caratteristiche generali

L' α -L-ramnosidasi è un enzima, appartenente alla classe delle idrolasi (Rha, EC.3.2.1.40), che catalizza la rottura di legami glicosidici (glicosidasi) del ramnosio con altri composti. È un enzima poco studiato, e complessivamente, in letteratura esiste un esiguo numero di lavori che riportino notizie sulla caratterizzazione e sulla purificazione di questa enzima da matrice fungina.

Il ramnosio rappresenta la porzione idrolizzata dall'enzima Rha e costituisce il residuo zuccherino di molti flavonoidi diffusi in natura nei pigmenti delle piante e nei complessi etero polisaccaridi; alcuni ramnosidi sono importanti composti bioattivi, come saponine citotossiche (*Bader et al., 1998; Yu et al., 2002*) che sono glicoalcaloidi antifungini nelle piante (*Oda et al., 2002*).

2.7.2 Alcune applicazioni

Le maggiori applicazioni tecnologiche della Rha sono quelle nel settore alimentare: la deamarizzazione dei succhi d'arance, di pompelmo e di limone. Da metà degli anni '60 sono cominciati i primi studi sui precursori (potenzialmente aromatici) glicosidici dell'uva.

I flavonoidi glucosidi più importanti che contengono L-ramnosio, sono la naringina, l'esperidina e la rutina, composti abbondantemente presenti in natura.

La naringina è il principale flavonoide glicoside nel succo di pompelmo ed è il responsabile del sapore amaro; l'esperidina è il flavonoide glicoside predominante nei limoni e nelle arance dolci, e la rutina è un flavone glicoside presenti nel succo del mosto e nei vegetali.

Il composto principalmente responsabile dell'amaro, nei succhi di agrumi, è il flavonoide Naringina (α -ramnosil-(1-2)- β -glucosil-(1-7)-naringenina) presente soprattutto nel pompelmo (buccia e albedo). L'enzima Rha idrolizza il glucoside flavonoide liberando l'L-ramnosio e il corrispondente glucoside. Ma l'azione associata di una α -L-ramnosidasi e di una β -D-glucosidasi lo converte nel composto non amaro naringenina, passando attraverso l'intermedio prunina.

Oltre all'eliminazione del sapore amaro negli agrumi causato dalla presenza della naringina (*Puri et al. 1996*), altre applicazioni tecnologiche si sono concentrate nell'idrolisi dell'esperidina come precursore nella produzione degli zuccheri (*Chase, 1974*).

2.8 β -D-glucosidasi

2.8.1 Caratteristiche generali

La β -glucosidasi (β G, EC 3.2.1.21) catalizza l'idrolisi della β -glicoside legato tra due residui di gliconi (es. cellobiosio e altri β -linked oligosaccarisi) o tra glucosio e un aglicone arilico o alchilico (es. diversi substrati naturali presenti nelle piante).

L'enzima racchiude un gruppo altamente eterogeneo di enzimi idrolitici (*Bhatia et al., 2002*) ed è presente universalmente in tutti e tre regni degli organismi viventi (Eucarioti,

Archea, e Eubatteri), infatti è stato ritrovato in diversi organismi, come batteri (*Kateyeva et al., 1992; Paavilainen et al., 1993; Sestelo et al., 2004*), funghi (*Riccio et al., 1999; Jäger et al., 2001; Belancic et al., 2003*), piante (*Sue et al., 2000; Randall et al., 2001; Gerardi et al., 2001*) e animali (*Marana et al., 1995; Hays et al., 1998; Pontoh & Low, 2002*), incluso gli uomini (*Grace et al., 1994; Day et al., 1998; Nemeth et al., 2003*).

La principale reazione di catalizzazione per questi tipi di enzimi è l'idrolisi dei legami β -glicosidici in glicosidi a basso peso molecolare.

La β G recentemente è stato il focus di molte ricerche poiché ha un ruolo chiave nei processi biologici (es. crescita e sviluppo, difese chimiche, interazioni ospite-parassita, lisi delle cellule, lignificazione, metabolismo glicosilceramide e vitamina B6, etc.) e processi biotecnologici (conversione di biomasse, disintossicazione alimenti, e miglioramento della qualità del beverage).

Questo enzima viene generalmente classificato sulla base di diversi criteri: o in relazione alla specificità con il substrato, o all'affinità tra la composizione e sequenza di amminoacidi (*Bhatia et al., 2002*).

2.8.2 Alcune applicazioni

L'importanza della β G sulla qualità e sui processi degli alimenti è stata abilmente approfondita dallo studioso Guñata, soprattutto sulla capacità di migliorare il flavor nei succhi di frutta e in diverse bevande. Ci sono più di cento differenti precursori flavo β - glucosidici individuati nelle piante, gli agliconi sono prodotti di sequenze mevalonate o shikimate. Chiaramente, ci sono β -glucosidasi nel tessuto delle piante che idrolizzano questi precursori dei flavour. Così, in ciascun caso è necessario isolare e caratterizzare l'enzima specifico che idrolizza un β -glucoside di cui metà aglicone è di particolare interesse per la qualità e per i processi alimentari.

La porzione edibile di alcune piante contengono sistemi β -D-glucosidase- β -glucoside che produce agliconi tossici o HCN in risposta alla lacerazione del tessuto e durante la formazione di gomme protettive.

3. Stato dell'arte

3.1 α -L-rhamnosidasi

L' α -L-rhamnosidasi (Rha, EC. 3.2.1.40) scinde in maniera specifica l'L-ramnosio da un ampio numero di composti naturali, quali naringina, rutina, quercetina ed esperidina. Si trova facilmente in natura, soprattutto nei vegetali, animali, funghi e batteri. Riveste un ruolo biotecnologico molto importante grazie alle sue svariate applicazioni industriali: deamarizzazione dei succhi di agrumi (Gray et al., 1981; Tsen et al., 1991; Yadav et al., 2000; Prakash et al., 2002; Busto et al., 2007), produzione di prunina a partire dalla naringina (Roitner et al., 1984), idrolisi dell' α -L-ramnosio terminale da composti glicosidici (Cheetham et al., 1991), miglioramento dell'aroma dei vini tramite idrolisi enzimatica di composti terpenici (Caldini et al., 1994; Spagna et al., 2002), eliminazione dei cristalli di esperidina dai succhi di agrumi (Yoshinobu et al., 1995), la deramnosilazione di steroidi ramnosidici importanti dal punto di vista clinico (Feng et al., 2005; Monti et al., 2004; Yu et al., 2002). Alcuni autori hanno studiato la Rha presente in preparati commerciali contenenti esperidinasi (Monti et al., 2004) e naringinasi (Romero et al., 1985), utilizzati industrialmente nella deamarizzazione dei succhi di frutta.

3.2 Fonti di α -L-rhamnosidasi

Attività α -L-rhamnosidasica è stata scoperta per la prima volta in un complesso enzimatico, isolato nel 1938 da semi di sedano (Hall, 1938). La presenza di questo enzima è stata in seguito riscontrata anche nelle foglie di pompelmo (Thomas et al., 1958; Tinge et al., 1958) e nei semi di grano saraceno (Bourbouze et al., 1975).

Le fonti animali di α -L-rhamnosidasi sono due: dal fegato di Turbo cornutus, un gasteropode di mare (Kurosawa et al., 1973) e dal maiale (Qian et al., 2005). Diversi microrganismi mostrano attività α -L-rhamnosidasica, come i batteri *Bacteroid JY-6* (Jang et al., 1996) e *Fusabacterium K-60* (Park et al., 2005), che si trovano nell'intestino umano. Altri batteri produttori di Rha sono il *Clostridium stercorarium*, un batterio termofilo anaerobico (Zverlov et al., 2000), e *Pseudoalteromonas species* e *Ralstonia picketti*, isolati dall'acqua marina dell'ambiente sub Antartico, che sono in grado di produrre una Rha attiva a temperature comprese tra -1 e 8°C (Orrillo et al., 2007). Il *Bacillus* spGL1 e lo

Sphingomonas paucimobilis hanno mostrato un'ottima attività ramnosidasi quando cresciuti in un terreno che conteneva gellan come fonte di carbonio (Hashimoto et al., 1998; Hashimoto et al., 1999). Inoltre, tra i lieviti, *Pichia angusta* X349, è dimostrato essere un ottimo produttore di Rha (Yanai et al., 2000), e recentemente è stata isolata una Rha da *Pichia gulliermondii*, per l'applicazione in enologia (Rodriguez et al., 2010).

Dalla notevole quantità di studi presenti in letteratura, si evince che i funghi sono i microrganismi più utilizzati per la produzione di Rha. Utilizzando come induttore rutina, naringina, L-ramnosio o esperidina è possibile produrre Rha da diversi ceppi di funghi: *Acremonium persicinum*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Circinella muscae*, *Emericella nidulans*, *Eurotium amstelodami*, *Fusarium oxysporum*, *Mortierella alpina*, *Mucor circinelloides griseo-cyanus*, *Penicillium oxalicum*, *Rhizopus arrhizus*, *Talaromyces flavus* e *Trichoderma harzianum* (Monti et al., 2004). È stata riscontrata attività ramnosidasi extracellulare in un ceppo di *Rhizopus nigricans* (Shanmugam et al., 1995) e numerose specie di *Aspergillus* sono ottime produttrici (Yadav et al., 2001; Mazanares et al., 2001; Orejas et al., 1999; Puri et al., 2005; Koseki et al., 2008). In commercio sono disponibili solo due preparati enzimatici come fonti di esperidinasi e naringinasi rispettivamente da *Aspergillus niger* e *Penicillium species* (Monti et al., 2004) e da *Penicillium decumbens* (Romero et al., 1985).

3.3 Purificazione e caratterizzazione dell' α -L-ramnosidasi

La Rha estratta dal fegato del Turbo cornutus, è stata purificata con una colonna cromatografica di CM cellulosa e Sephadex G-150 e trattamenti di congelamento-scongelo (Kurosawa et al., 1973), quella presente nel fegato di maiale è stata estratta in soluzione tampone e precipitata con ammonio solfato, successivamente è stata sottoposta a dialisi e purificata con cromatografia a scambio ionico su DEAE-cellulosa (Qian et al., 2005). Per la Rha da grano saraceno (*Fagopyrum esculentum*) l'estratto crudo è stato trattato con ammonio solfato e infine purificato cromatograficamente su colonna Sephadex G-75, DEAE-Sephadex e Ultrogel AcA-44 (Bourbouze et al., 1976). La Rha isolata dal batterio umano intestinale, *Bacteroid JY-6*, è stata purificata tramite ultrasuoni ed estrazione dell'enzima con tampone fosfato, precipitata in seguito con ammonio solfato e purificata tramite cromatografia su DEAE-cellulosa, Silice-PAE, Sephacryl S-300 e idrossiapatite (Jang et al., 1996). L' α -L-ramnosidasi estratta dal *Fusobacterium K-60*, un

altro batterio isolato dall'intestino umano, è stata purificata in vari step su resina Butyl-Toyopearl, idrossiapatite, Sephacryl S-300 e Q-Sepharose (Park et al., 2005).

Dal *Bacillus sp. GL1* la Rha è stata estratta tramite ultrasuoni, precipitata con ammonio solfato e purificata con colonna cromatografica utilizzando diverse fasi stazionarie: DEAE-Sepharose CL-6B, Butyl-Toyopearl 650M, Sephacryl S-200HR e QAE-Sephadex A-25 (Hashimoto et al., 1999). Miake et al. hanno caratterizzato e purificato una ramnosidasi intracellulare da *Pseudomonas paucimobilis FP2001*. Invece Zverlov et al. hanno purificato e caratterizzato una ramnosidasi termostabile da *C. stercorarium* (Miake et al., 2000; Zverlov et al., 2000). La Rha dal lievito, *Pichia angusta X349*, è purificata tramite trattamento con ammonio solfato e diversi passaggi su vari tipi di fasi stazionarie: concanavalina-A-Sepharose, DEAE Bio Gel A agarose, Rhamnose-Sepharose 6B e idrossiapatite (Yanai et al., 2000).

Roitner et al. (Roitner et al., 1984) hanno tentato di caratterizzare un preparato enzimatico commerciale da *Aspergillus niger* contenente una naringinasi, che presentava sia attività α -L-ramnosidasi che β -D-glucosidasi. Tramite gel filtration il complesso enzimatico è stato separato in varie subunità di oligomeri con massa molecolare di 95 kDa, che mostravano entrambe le attività o solo attività ramnosidasi.

Soria et al. (Soria et al., 1999) hanno purificato una Rha da *Aspergillus terreus* coltivato in un terreno contenente ramnosio o naringina come fonte di carbonio. Il processo di purificazione ha incluso una precipitazione con ammonio solfato, cromatografia a scambio ionico su DEAE-Sepharose CL-6B, gel filtration su Sephadex-G 200. La β G è stata separata con successo dalla Rha quando come induttore è stato utilizzato il ramnosio.

Un *Aspergillus nidulans* è stato coltivato utilizzando il ramnosio come sola fonte di carbonio e la Rha ottenuta dal processo di fermentazione è stata purificata con una combinazione di step di cromatografia di adsorbimento su DEAE-50, su colonna Hi Load 16/10 Q sepharose FF e Hi Load 26/S Sepharose FF, e infine una gel filtration su colonna Superose 12 HR 10/30 (Manzanares et al., 2000). Lo stesso autore ha caratterizzato e purificato usando cromatografia a scambio cationico e gel filtration, due differenti Rha, RhaA e RhaB, da *Aspergillus aculeatus* coltivato in presenza di esperidina.

Puri e Kalra hanno caratterizzato e purificato una naringinasi da *Aspergillus niger*. Il primo step della purificazione è stata la precipitazione con ammonio solfato, successivamente il precipitato è stato purificato con resina a scambio ionico Q Sepharose e una gel filtration su Sephadex G-200 (Puri et al., 2005).

Recentemente per la produzione di Rha è stato utilizzato l'*Aspergillus kawachii*, coltivato utilizzando ramnosio come sola fonte di carbonio. La purificazione è stata effettuata con precipitazione frazionata usando ammonio solfato, HPLC su resina a

scambio ionico e gel filtration. Dalla caratterizzazione è emerso che la Rha estratta è termostabile, in quanto se incubata a 60°C per 1h conserva l'80% della sua attività (*Koseki et al., 2008*).

Dalla caratterizzazione riportata in letteratura si evince che il range di pH ottimale per la Rha è 2.0-8.0, non viene riportata una Rha con un pH ottimale al di sopra di 8.0. Il range di temperatura ottimale riportato è 40-80°C, anche se è stata caratterizzata una Rha con una temperatura di 4°C (*Orrillo et al., 2007*). La massa molecolare riportata in letteratura va da un minimo di 53.0 kDa ad un massimo di 240.0 kDa.

Diversi studi hanno mostrato che la Rha è inibita da L-ramnosio, glucosio, acido citrico e diversi ioni di metalli (*Puri et al., 2005; Manzanares et al., 2000; Jang et al., 1996; Yanai et al., 2000; Orejas et al., 1999*).

3.4 Applicazioni biotecnologiche dell' α -L-ramnosidasi

Il gusto amaro dei succhi di agrumi è dovuto alla naringina e alla limonina. Esso viene rimosso trattando il succo con Rha che idrolizza la naringina in prunina e L-ramnosio. La prunina conferisce comunque un gusto amaro ai succhi ma che rappresenta solo un terzo rispetto a quello conferito dalla naringina. In letteratura sono presenti molti lavori sull'immobilizzazione della Rha (*Gray et al., 1981; Tsen et al., 1991; Yadav et al., 2000; Prakash et al., 2002; Busto et al., 2007; Puri et al., 1996; Afaq et al., 1997; Elinbaun et al., 2002; Birgisson et al., 2007; Ribeiro et al., 2008*) da utilizzare nella deamarizzazione dei succhi di agrumi, di cui alcuni sono stati brevettati (*Ito et al., 1970; Tanabe, 1971; Krasnobaev, 1973*).

L'esperidinasi è un complesso enzimatico con attività α -L-ramnosidasica e viene usata per prevenire la torbidità nei succhi di arancia confezionati, causata dalla precipitazione dei cristalli di esperidina (*Yoshinobu et al., 1995*). Il trattamento dei succhi di agrumi con Rha rende l'esperidina altamente solubile, e ciò permette di conservare i succhi per lunghi periodi di tempo senza formazione di cristalli (*Miyake et al., 1999*).

Linalolo, geraniolo, nerolo, citronellolo e α -terpenolo sono composti volatili responsabili dell'aroma del vino. Molti di questi si trovano nella buccia dell'uva come terpeni glicosidici inodori. L' α -L-ramnosidasi, la β -glucosidasi e l' α -arabinosidasi sono state immobilizzate ed utilizzate per accrescere l'aroma nei vini (*Caldini et al., 1994*). Manzanares et al. (*Manzanares et al., 2003*) hanno mostrato l'importanza della Rha per

incrementare la componente aromatica nei vini, verificando l'incremento di α -terpenolo, nerolo e linalolo quando il gene *rhaA* di *Aspergillus aculeatus*, che codifica la Rha, è stato espresso in ceppi industriali normalmente utilizzati nei processi di vinificazione. La Rha da *Pichia angusta X349* mostra un'elevata tolleranza verso il glucosio e l'etanolo, e questo dato fa supporre che potrebbe essere utilizzato nel processo di produzione dei vini (Yanai et al., 2000).

La Rha trova applicazione anche nella preparazione di farmaci e di precursori. Per esempio idrolizza il diosgene (una saponina) in L-ramnosio e diosgenina, che viene usato nella sintesi di farmaci steroidi come il progesterone (Elujoba et al., 1987). La Rha prodotta dalla *Curvularia lunata* è in grado di scindere l'L-ramnosio da numerose saponine steroidee (Feng et al., 2007).

La quercetina è un flavanolo ottenuto dalla deramnosilazione della quercetrina, la quale ha proprietà antiossidanti, anticancro, antiinfiammatorie, antiaggreganti e vasodilatatorie. Tramite test di laboratorio su animali è stata dimostrata l'attività anticancro dell'esperitina che si ottiene per azione della Rha e della β G sull'esperidina (Erlund et al., 2004).

La prunina, ottenuta in seguito alla deramnosilazione della naringina, presenta attività antiinfiammatorie e una buona attività contro i virus che attaccano il DNA/RNA (Kaul et al., 1985).

L'enzima Rha viene spesso utilizzato per la produzione di bevande funzionali (succo di ribes, succo d'arancia, tè verde) in quanto aumenta la biodisponibilità dei flavonoidi glicosidici (Barrio et al., 2004).

3.5 β -D-glucosidasi

La β -D-glucosidasi (β G, EC. 3.2.1.21) è un enzima di notevole importanza in biotecnologia. È capace di idrolizzare i glicosidi di monoterpeni, sesquiterpeni e di altri alcoli alifatici e aromatici, che sono tra le principali sostanze presenti nei vini, mosti (Williams et al., 1992; Guenguen et al., 1999; Williams et al., 1982) e succhi di frutta (Schawab et al., 1990; Schwab et al., 1990; Winterhalter, 1990). Questo enzima è anche in grado di idrolizzare antocianine, i principali pigmenti che si trovano negli alimenti di origine vegetale (Huang, 1956; Bloom et al., 1985; Martino et al., 1984).

3.6 Fonti di β -D-glucosidasi

Esistono molte fonti microbiche di β G, che vanno dai funghi, ai lieviti e batteri. Recentemente è stato studiato il *Penicillium decumbens*, un fungo filamentoso in grado di produrre β G extracellulare che scinde specificatamente la cellulosa (Chen et al., 2010). Diversi ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sono stati studiati come ottimi produttori di β G utilizzando glucosio come fonte di carbonio, la cui presenza sembra indispensabile al fine dell'espressione enzimatica specifica. Questo tipo di β G è di natura intracellulare ed è utile nelle prime fasi del processo di vinificazione (Mateo et al., 1997). Nel 2003 Hernandez ha effettuato uno screening su 60 ceppi diversi di *Saccharomyces* isolati in un ecosistema di vinificazione, valutando la produzione di β G in diverse condizioni di crescita su diversi substrati (Hernandez et al., 2003). Jager et al. hanno purificato e caratterizzato una β G da diversi ceppi di *Aspergillus*, ma in particolare da un *Aspergillus carbonarius* (Jager et al., 2001; Jager et al., 2005). La principale fonte di β G è l'*Aspergillus niger*, un fungo filamentoso tra i più importanti microrganismi usati in biotecnologia, oggetto di numerose ricerche. Nel 1989 Madamwar et al. hanno studiato la produzione di β G da *Aspergillus niger* su diverse fonti economiche di cellulosa come bagassa, microchip di computer, segatura e scarti di granoturco, tramite fermentazione liquida o su strato solido (Madamwar et al., 1989). L'*Aspergillus niger* è stato utilizzato per produrre β G in presenza di scarti agro-industriali come fonti di carbonio e come induttori per la sintesi dell'enzima (Martino et al., 1994). L'*Aspergillus niger*, essendo un microrganismo GRAS (Generally Recognised As Safe), è un ottimo candidato per la produzione di preparati enzimatici commerciali, su scala industriale. Essi sono ampiamente utilizzati dagli anni '70 in vari processi, soprattutto nella chiarificazione dei succhi di frutta e nel miglioramento del flavour dei vini (Le-Traon Masson et al., 1998; Cabaroglu et al., 2003; Mateo et al., 2000).

Una β G è stata purificata da frammenti di tessuti di frutti maturi di *Citrus sinensis* var. Valencia (Randall et al., 2001) e attività β -D-glucosidasica è stata riscontrata nel Tarocco, la più comune cultivar siciliana di arancia rossa (Barbagallo et al., 2007).

3.7 Caratterizzazione e immobilizzazione della β -D-glucosidasi

La β G estratta e caratterizzata da *Penicillium decumbens* ha mostrato le seguenti caratteristiche: peso molecolare di 120 kDa, con temperatura ottimale tra 65 e 70°C e pH ottimale tra 4.5 e 5.5, mantiene inoltre il 93,6% di attività se incubata a 50°C per 12 ore. Incubando l'enzima a pH 5.0 per 18 ore a temperatura ambiente, mantiene il 95% di attività (Chen et al., 2010).

La β G isolata da Hernandez nei 60 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* ha mostrato condizioni ottimali di attività a pH 4.0 e alla temperatura di 40-50°C, condizioni ideali per l'applicazione in enologia (Hernandez et al., 2003).

La β G isolata dalla varietà *Tarocco* ha mostrato valori ottimali di pH e temperatura rispettivamente di 4.5 di 60°C (Barbagallo et al., 2007). Quella isolata dalle parti membranose della varietà Valencia ha mostrato un pH ottimale tra 4.5 e 5.5, ed una temperatura ottimale di 40°C, è stata purificata con una combinazione di cromatografia su resina a scambio ionico e gel filtration (Superdex e Toyopearl HW-55S). Il suo peso molecolare è di 55 kDa (Randall et al., 2001).

Diversi studi sono stati effettuati sulla possibilità di immobilizzare la β G per svariati utilizzi, soprattutto industriali.

Una β G è stata immobilizzata su alginato tramite crosslinking -entrapment-crosslinking. L'attività ottenuta in seguito all'immobilizzazione è stata del 46.0% rispetto a quella originaria. La temperatura ottimale dell'enzima immobilizzato è stata di 45°C, 10° in meno rispetto alla temperatura ottimale dell'enzima libero. Mentre il valore di pH ottimale non subisce cambiamenti. Questo enzima è stato utilizzato per il trattamento del the e ne sono stati investigati gli effetti sull'incremento dell'aroma. Ha anche mostrato una buona stabilità, conservando quasi il 74% di attività nei 42 giorni successivi all'immobilizzazione (Erzheng et al., 2010).

Una β G commerciale è stata immobilizzata per l'idrolisi di cellulosa su una resina epossidica, Eupergit C. I risultati hanno dimostrato che l'attività dell'enzima immobilizzato è uguale all'enzima libero, e mantiene la sua attività per diversi turnover (Maobing et al., 2006).

La β G è un enzima largamente utilizzato per aumentare il flavour del vino, infatti una β G da *Candida molischiana* 35M5N è stata immobilizzata su una resina, Duolite A-568, con un altro grado di immobilizzazione (86%) ed è stato utilizzata per migliorare l'aroma del vino Moscato. In seguito al trattamento è stata effettuata l'analisi al GC-MS per identificare i precursori aromatici (Yannick et al., 1997).

4. Immobilizzazione enzimatica

4.1 Un po' di storia

Per molti decenni gli enzimi sono stati utilizzati nell'industria alimentare e chimico-farmaceutica nella loro forma nativa. Inoltre le moderne tecniche di ingegneria genetica hanno permesso di produrre una grande varietà di enzimi in grado di lavorare in condizioni sfavorevoli, rendendoli resistenti ad elevate o a bassissime temperature, a valori estremi di pH, attivi in solventi organici, e attivi per molti cicli reattivi. Naturalmente il costo di questi enzimi risulta essere molto elevato.

Da questa problematica è nato l'interesse per gli enzimi immobilizzati: ovvero quando un enzima viene ancorato ad un supporto organico o inorganico attraverso un legame fisico o chimico, limitandone la sua mobilità nel mezzo di utilizzo.

La tematica dell'immobilizzazione è stata scoperta negli anni '70, quando Katchalski-Katzir al primo "Enzyme Engineering Conference" di Hnniker (USA) ne diede la definizione:

“Un enzima fisicamente confinato o localizzato in una data regione dello spazio, catalicamente attivo, può essere usato ciclicamente nel tempo”

(Katchalsky-Katzir 1999)

Lo studio delle tecniche di immobilizzazione su supporti fisici deriva dalla possibilità di separare l'enzima dal mezzo di reazione, di riutilizzarlo e sfruttarne tutta l'attività residua, ed evitando al contempo la contaminazione dei prodotti. Quindi questa tecnica rende possibile l'utilizzo in continuo di un enzima, di migliorarne la stabilità e l'attività dell'enzima stesso, e di conseguenza incrementarne la produttività.

4.2 Vantaggi e svantaggi dell'immobilizzazione

Come ogni tecnica scientifica, anche l'immobilizzazione comporta dei vantaggi e degli svantaggi. Vediamo nello specifico quali possono essere i pro e contro di questa metodologia.

Vantaggi

- ✓ Aumento della stabilità
- ✓ Riutilizzo

- ✓ Contenimento del consumo energetico
- ✓ Maggior velocità di reazione
- ✓ Minor produzione di inquinanti
- ✓ Possibilità di modulare attività e specificità

Svantaggi

- ✓ Inattivazione dell'enzima per denaturazione parziale o totale
- ✓ Inattivazione dell'enzima per formazione di legami tra sito attivo e supporto
- ✓ Difficoltà di accesso del substrato al sito attivo
- ✓ Elevati costi di immobilizzazione

4.3 Tecniche di immobilizzazione

I supporti su cui è possibile effettuare l'immobilizzazione sono materiali insolubili, organici o inorganici. Una matrice è adatta all'immobilizzazione quando è in grado di soddisfare determinate caratteristiche: inerzia chimica, economicità, stabilità, capacità di incrementare la specificità dell'enzima riducendo l'inibizione verso il prodotto, la possibilità di variare il pH ottimale in base alle condizioni richieste dal processo, bloccare la contaminazione microbica.

La massima capacità di legame è influenzata da due fattori: il volume dell'enzima e la densità superficiale dei siti di legame, se parliamo di immobilizzazione covalente, o l'area superficiale disponibile, se parliamo di immobilizzazione per adsorbimento. Questa capacità è anche influenzata dalle proprietà elettrostatiche e dal grado di polarità delle superfici della matrice e dell'enzima, ma anche da altre caratteristiche della matrice stessa come tipologia, porosità, distribuzione e dimensione dei pori. Questo a sua volta si ripercuoterà sulla quantità di enzima caricato e la sua attività.

Da un punto di vista industriale sarà scelto un supporto che abbia un basso impatto economico, sia per il processo di immobilizzazione in sé, che per lo smaltimento del supporto una volta esaurita l'attività enzimatica.

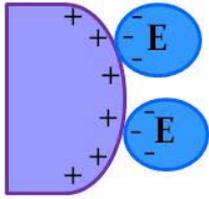
Le principali tecniche di immobilizzazione utilizzate nell'ambito della ricerca e dell'industria possono essere raggruppate in quattro categorie:

- ✓ Adsorbimento
- ✓ Formazione di legami covalenti
- ✓ Intrappolamento

- ✓ Incapsulamento

Adsorbimento

Questo tipo di immobilizzazione è uno dei metodi più antichi ed è sicuramente la tecnica di più facile esecuzione, in quanto è sufficiente miscelare il supporto con l'enzima in opportune condizioni di pH e forza ionica. Si basa sull'attrazione elettrostatica fra le cariche di segno opposto esistenti sull'enzima e sul supporto. I legami che entrano in

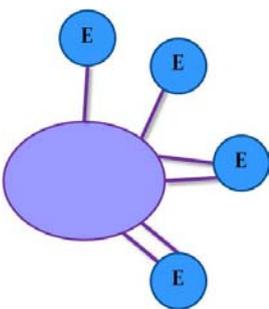


gioco sono forze deboli di van der Waals, interazioni idrofobiche, legami idrogeno. Questa metodica ha il vantaggio di essere poco influente sulla modificazione conformazionale dell'enzima legato, di mantenere quasi intatta l'attività enzimatica, avendo anche una buona capacità di carico.

Tra gli svantaggi bisogna invece considerare una certa debolezza del legame e il possibile desorbimento dell'enzima dal supporto per piccoli cambiamenti di temperatura, concentrazione del substrato, pH e forza ionica del mezzo. Tra le matrici utilizzate troviamo vetro poroso, argilla, resine polimeriche, silice e matrici a scambio ionico.

Formazione di legami covalenti

Con questa tecnica, l'enzima forma dei legami covalenti con il supporto, che può essere organico o inorganico, sintetico o naturale. Il vantaggio dell'immobilizzazione

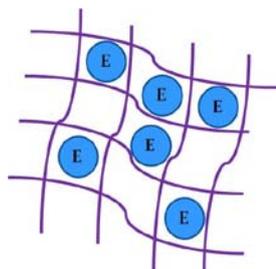


covalente è la natura del legame tra enzima e supporto: essendo un legame molto forte non viene influenzato da variazioni di pH, di temperatura, di forza ionica o di concentrazione del substrato. A causa di diversi fattori, si ha lo svantaggio che solo piccole quantità di enzima possono essere caricate sul supporto. La reattività dell'enzima dipende dalla disposizione superficiale e dal potere nucleofilo dei gruppi funzionali presenti nelle catene laterali. La reattività di questi

gruppi è determinata dalla loro protonazione, che può essere "regolata" variando il pH della soluzione in base ai valori di pKa dei gruppi ionizzabili. Dall'altra lato il supporto deve subire una serie di reazioni di attivazione che rendano disponibili i gruppi necessari alla formazione del legame. Gli svantaggi di questo tipo di immobilizzazione sono essenzialmente due: il cambiamento della conformazione dell'enzima, in seguito alla formazione del legame, e la possibilità che la formazione del legame tra l'enzima e il supporto renda inaccessibile il sito attivo. Quest'ultimo inconveniente potrebbe essere

risolto interponendo tra enzima e supporto un “braccio spaziatore” costituito generalmente da una catena di 5-6 atomi di carbonio dotati di grande flessibilità.

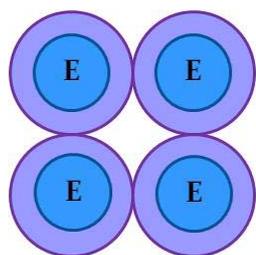
Intrappolamento



Con questo metodo l'enzima viene intrappolato in gel o fibre. Si realizza facendo avvenire, in presenza dell'enzima, reazioni di polimerizzazione di materiali come acrilamide, gel di silice o acetato di cellulosa, in grado di passare da uno stato fluido (*sol*) ad uno stato solido (*gel*), formando un sistema amorfo reticolato che intrappola, in maniera random, l'enzima tra le maglie (Reetz 1997). Tale processo è piuttosto complesso e implica una drastica diminuzione dell'attività enzimatica ed è conveniente solo con sistemi che implichino l'utilizzo di substrati e prodotti a basso peso molecolare, a causa delle difficoltà di diffusione che le molecole possono incontrare avvicinandosi o allontanandosi dal sito catalitico.

Incapsulamento

Questa tecnica ha riscontrato notevole successo negli ultimi anni. Molto simile alla tecnica dell'intrappolamento, ma a differenza di quest'ultima, si ha la possibilità di ottenere una struttura solida ordinata e di poter controllare adeguatamente la dimensione dei pori in quanto il solido viene “costruito” attorno all'enzima. È il caso dei materiali mesoporosi ordinati (OMM). Questo tipo di tecnica offre un discreto controllo della reticolazione con la semplice aggiunta di un surfattante e aggiustando opportunamente le condizioni di sintesi (Zhao et al., 1998). L'enzima viene disperso in una soluzione acquosa di surfattante opportuno il quale circonda l'enzima formando delle micelle. Alla soluzione enzima-surfattante viene aggiunta una fonte di silice che circonda l'enzima polimerizzando. Il surfattante viene rimosso in un successivo step (Urrego et al., 2010). Questa tecnica ha il vantaggio di poter far lavorare l'enzima in diverse condizioni di pH e temperatura senza alterarne la conformazione.



5. Materiali e metodi

5.1 Materiale reagente e apparecchiature

5.1.1 Formulazione del terreno di coltura

KCl (Sigma Milano, Italia); KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich); NH_4Cl (Sigma-Aldrich); yeast extract (OXOID Milano, Italia); soluzione vishniac (Vishniac and Santer, 1954); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich). (Monti et al. 2004)

5.1.2 Strumentazione

- Agitatore VDRL digitale mod. 711/D:
- Incubatore 2008 High Performance Incubator
- Pompa da vuoto a membrana KNF LABOPORT
- Centrifuga ALC 4239R dotata di rotore 6346 RPM Max 12000
- Spettrofotometro Perkin Elmer precisely, Lamda 25 (UV/VIS Spectrometer)

5.1.3 Substrati e reattivi per l'analisi dell'attività enzimatica e del contenuto proteico

- *p*-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside (*p*NPR) PM: 285,3 (Sigma-Aldrich).
- *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*NPG) PM: 301,3 (Sigma-Aldrich).
- Esperidina commerciale (induttore) PM: 610,6 (Sigma-Aldrich).
- Coomassie brilliant blue G250: colorante per proteine (Biorad).

5.1.4 Inibitori

- Glucosio: solido bianco cristallino PM: 180,2 (Baker)
- Fruttosio: solido bianco cristallino PM: 180,2 (Fluka)
- Ramnosio: solido bianco cristallino PM: 182,2 (Applichem)
- Acido ascorbico: solido bianco cristallino PM: 176,13 (Carlo Erba)

5.1.5 Tamponi utilizzati

- Citrato-fosfato (CP).
- HCl/KCl.
- NaHCO₃/NaOH.
- Acido borico/borato di sodio.

5.1.6 Ceppi fungini

I ceppi fungini con sigla CCF sono stati forniti dal Dipartimento di botanica dell'Università Charles di Praga, Repubblica Ceca; uno ceppo è stato fornito dal CRA di Bologna, ex Istituto di Colture Industriali.

- *Aspergillus aculeatus* CCF 108
- *Aspergillus terreus* CCF 3059
- *Emericella nidulans* CCF 2912
- *Aspergillus niger*

5.1.7 Supporti per la purificazione

- Chitosano
- Bentonite
- Allumina, Al₂O₃
- Amberlite XAD 16 (Fluka)

5.1.8 Supporti per l'immobilizzazione enzimatica

- Eupergit C (Sigma-Aldrich)
- TMOS (Sigma-Aldrich)
- P127
- CTMABr (Sigma-Aldrich)
- Silice amorfa MS3030 ø 27 nm (PQ Corporation, Conishohocken, USA)

5.2 Metodologie analitiche

5.2.1 Messa a punto della fermentazione per la produzione di α -L-Rhamnosidasi e β -D-glucosidasi con l'impiego di induttori naturali

L'enzima è stato prodotto da quattro ceppi fungini utilizzando come induttori sia esperidina commerciale, secondo quanto riportato dal lavoro di Monti D. et al., 2004, sia pastazzo d'agrumi.

Il terreno, preparato in apposite beute frangiflutti, è stato sterilizzato a 121°C ed in seguito inoculato con i quattro ceppi fungini: *A. aculeatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*.

5.2.2 Preparazione dei terreni

1. Terreno di coltura con induttore esperidina commerciale
2. Terreno di coltura con induttore pastazzo d'agrumi
3. Terreno senza induttore

Prima dell'aggiunta al terreno di coltura, il pastazzo è stato lavato in acqua distillata, tenuto in agitazione per 24 h e fatto asciugare in stufa fino a completa eliminazione dell'acqua.

Le condizioni di crescita sono state a 30°C per 17 giorni in costante agitazione su rotore basculante. Ogni 24 ore sono state determinate le attività enzimatiche sul surnatante.

Il brodo di coltura ottenuto è stato filtrato sottovuoto con carta da filtro Albet 145 (7-11 μ m) e centrifugato per 20' a 10000 rpm.

5.2.3 Determinazione delle attività α -L-ramnosidasica e β -D-glucosidasica nei ceppi fungini

La determinazione delle attività enzimatiche è stata effettuata qualitativamente e quantitativamente per tutti i quattro ceppi fungini inoculati nei terreni con e senza induttore, secondo il metodo di Spagna et al., 2000. L'attività degli enzimi è stata saggiata giornalmente sia sul surnatante che sul pellet.

*5.2.4 Caratterizzazione chimico-fisica e cinetica della α -L-ramnosidasi e β -D-glucosidasi da *Aspergillus terreus**

La caratterizzazione chimico-fisica e cinetica della Rha e della β Gè stata effettuata sul surnatante opportunamente diluito in tampone C-P 0.15 M. Sono stati determinati i seguenti parametri:

- Determinazione della V_{max} e K_m
- Stabilità a 50°C e pH 4.0
- pH ottimale
- Temperatura ottimale
- Inibizione da: glucosio, fruttosio, ramnosio, acido ascorbico (vitamina C).
- Determinazione delle proteine

5.2.5 Determinazione della V_{max} e K_m di α -L-ramnosidasi e β -D-glucosidasi

Per la determinazione del substrato di saturazione sono stati preparati i substrati a diverse concentrazioni, fino a saturazione, condizione che ha permesso di determinare la V_{max} . Le prove sono condotte sul surnatante, variando di volta in volta la concentrazione del substrato aggiunto.

5.2.6 Stabilità nelle condizioni ottimali

Per determinare la stabilità nel tempo di entrambi gli enzimi nelle rispettive condizioni ottimali si è proceduto nel seguente modo. Il surnatante è stato opportunamente diluito in tampone C-P pH 4.0, in modo tale da avere un'attività enzimatica iniziale molto alta, e posto poi a 50°C. In seguito l'attività è stata misurata su 800 μ l di soluzione enzimatica, prelevati a diversi intervalli di tempo, utilizzando la condizione di substrato ottimale.

5.2.7 pH ottimale

Per valutare l'effetto del pH sulle due attività enzimatiche sono state eseguite diverse prove utilizzando di volta in volta tampone C-P 0.15 M (da pH 3.0 a pH 8.0), tampone HCl/KCl per pH 2.0 e tampone acido borico/borato per pH 9.0.

5.2.8 Temperatura ottimale

Per questa prova, la soluzione enzimatica è stata posta ad incubare in bagno termostato variando di volta in volta la temperatura. Per bloccare la reazione a temperature maggiori di 40°C, è stato usato Na₂CO₃ freddo, previa immersione per 10' in bagno di ghiaccio.

5.2.9 Inibizione da glucosio, fruttosio, ramnosio e acido ascorbico per Rha e βG

Le prove di inibizione da parte degli zuccheri sono state condotte nello stesso modo variando di volta in volta il tipo di zucchero e la percentuale dello stesso. In particolare, le concentrazioni di zuccheri saggiate sono state, per il glucosio, fino al 25% per la βG e al 75% per la rha; per il fruttosio fino al 65% per la βG e fino al 56% per la rha; per il ramnosio fino al 70 % per la βG e fino al 2,5% per la rha; per l'acido citrico fino al 3,5% sia per la rha che per la βG. Tutti i saggi sono stati eseguiti come osservato in precedenza, eccetto che per le concentrazioni degli zuccheri e del tampone aggiunti, in quantità proporzionale, calcolata sul medesimo volume totale.

5.2.10 Determinazione delle proteine

Per la determinazione delle proteine, è stato utilizzato il metodo di Bradford, come da protocollo (*Bradford 1975*) opportunamente adattato ai campioni. L'intensa colorazione azzurra prodotta viene letta a $\lambda=595$ nm (cfr. bianco). Si costruisce la curva di taratura Abs vs $\mu\text{g} / \text{ml}$ proteina utilizzando come proteina albumina bovina (BSA).

5.2.11 Purificazione

Per ogni supporto sono stati utilizzati tre valori di pH: 4.0, 5.0 e 6.0. Le prove sono avvenute tutte a temperatura ambiente e la soluzione enzimatica è rimasta a contatto con il supporto per un tempo variabile che va da 2 a 4 ore.

5.2.12 Inattivazione termica

Per eliminare l'attività β -glucosidasica, 100 mg di liofilizzato della soluzione enzimatica sono stati solubilizzati in 5 ml di tampone $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$ 0,065 M a pH 11.0 e incubata per 2 ore a 50°C.

5.2.13 Immobilizzazione

- Legame covalente: 100 mg di liofilizzato sono stati solubilizzati in 5 ml di tampone $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$ pH 9.0 in presenza di 100 mg di resina Eupergit C per 24 ore.
- Entrapment: 500 mg di liofilizzato sono stati solubilizzati in 10 ml di tampone C-P pH 5.0 e sono stati aggiunti 3,8 ml di TMOS. La soluzione è stata mantenuta in leggera agitazione per 10 giorni a temperatura ambiente.
- Microincapsulazione: 1) 0,3388 g di surfattante P127 vengono solubilizzati in 24 ml di tampone C-P pH 3.5 e mantenuti in leggera agitazione a 35°C. A questa soluzione vengono aggiunti 0,99 g di KCl. La soluzione viene lasciata in agitazione per un'ora. Successivamente è stata aggiunta la soluzione enzimatica, preparata solubilizzando 2 g di liofilizzato in 8 ml di tampone pH 3.5. 2) 3,633 g di surfattante CTMABr sono stati solubilizzati in 30 ml di tampone C-P pH 7.0 e la soluzione è stata mantenuta in agitazione a 35°C per un'ora. Successivamente è stata aggiunta la soluzione enzimatica, preparata solubilizzando 2 g di liofilizzato in 8 ml di tampone pH 7.0.
- Adsorbimento: 600 mg di silice MS3030 sono stati sospesi in 60 ml di tampone C-P pH 3,5. A questa sospensione sono stati aggiunti 25 mg di liofilizzato. La soluzione è rimasta in incubazione a temperatura ambiente per tre ore.

6. Risultati e discussioni

6.1 Scelta del ceppo fungino migliore

Quattro ceppi fungini appartenenti al genere *Aspergillus* (*A.terreus*, *E.nidulans*, *A.aculeatus*, *A.niger*) sono stati coltivati per 17 giorni in terreno liquido modificato (Monti et al., 2004) con e senza induttore (esperidina o pastazzo). Da questo screening è emerso che per la fermentazione condotta in presenza di induttore tutti i ceppi presentavano attività α -L-ramnosidasica e β -D-glucosidasica, entrambe di tipo extracellulare, e quindi presenti nel surnatante ed assenti nelle cellule. Quando invece la fermentazione è stata condotta in assenza di induttore è stata riscontrata una debole attività α -L-ramnosidasica per il ceppo *A. terreus* ($5 \cdot 10^{-4}$ U/ml) (**Fig. 6.1**) e una debole attività β -D-glucosidasica per *A. aculeatus* ($2.7 \cdot 10^{-2}$ U/ml). *Aspergillus terreus* è stato il ceppo fungino scelto come migliore produttore di Rha.

Durante la fermentazione l'attività di entrambi gli enzimi è stata monitorata periodicamente e quantitativamente sul surnatante, sia nel caso della fermentazione con induttore sia in quella effettuata senza induttore. Dai saggi effettuati si ha che l'attività è più elevata nelle colture con induttore rispetto a quelle senza: la presenza di un induttore risulta essere un fattore determinante nel processo di fermentazione. Infatti confrontando i valori delle attività enzimatiche ottenuti nelle prove in presenza di esperidina e nelle prove con pastazzo, è possibile notare che essi sono paragonabili per *A.terreus* (**Fig. 6.5; Tab. 6.3 e Tab. 6.5**). Le attività specifiche relative per i due enzimi risultano essere 16,87 U/mg per l' α -L-ramnosidasi (Rha) e 22,43 U/mg per la β -D-glucosidasi (β G).

6.2 Caratterizzazione dell' α -L-ramnosidasi e della β -D-glucosidasi da *A. terreus*

Sul surnatante ottenuto dalla coltura del ceppo fungino di *A. terreus* con pastazzo, è stata eseguita la caratterizzazione chimico-fisica e cinetica della Rha e della β G.

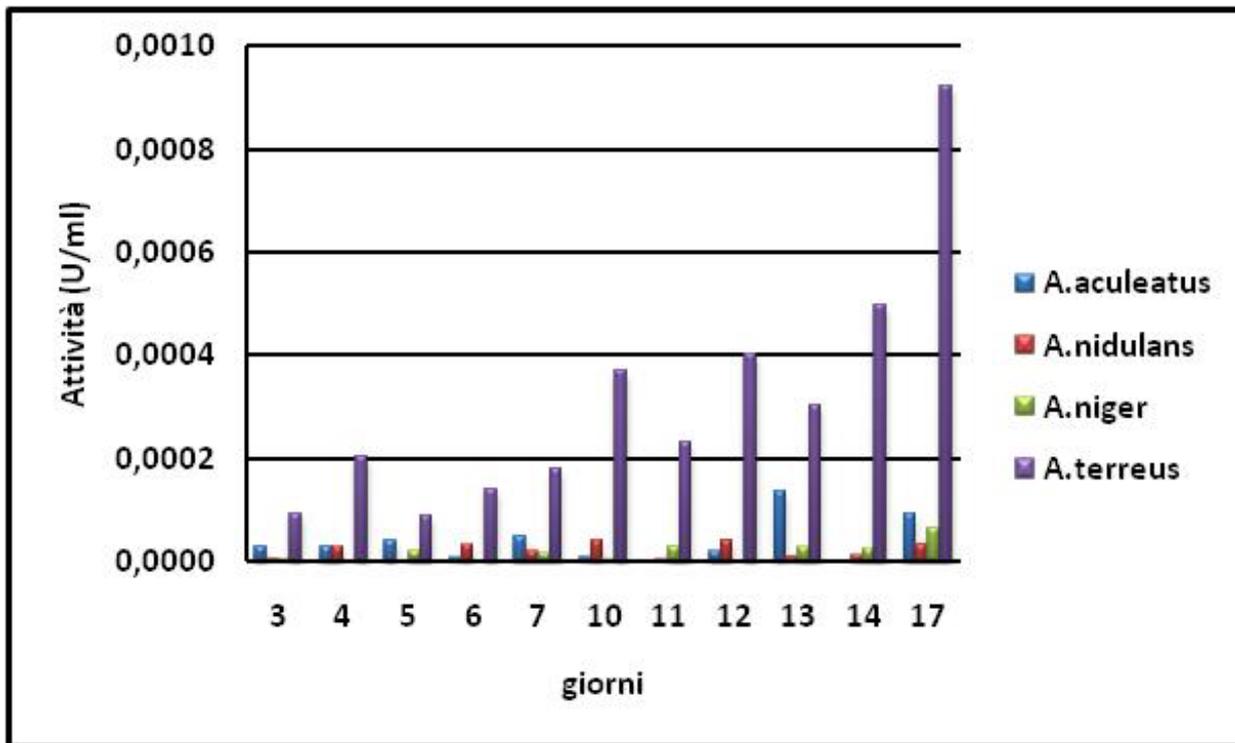


Figura 6.1 - Screening attività dell' α -L-ramnosidasi nei ceppi di *Aspergillus* in assenza di induttore.

CEPPI	GIORNI										
	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17
A. aculeatus	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0001
A. nidulans	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
A. niger	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001
A. terreus	0,0001	0,0002	0,0001	0,0001	0,0002	0,0004	0,0002	0,0004	0,0003	0,0005	0,0009

Tabella 6.1- Dati relativi al monitoraggio dell'attività enzimatica dell' α -L-ramnosidasi (U/ml) durante la fermentazione in assenza di induttore.

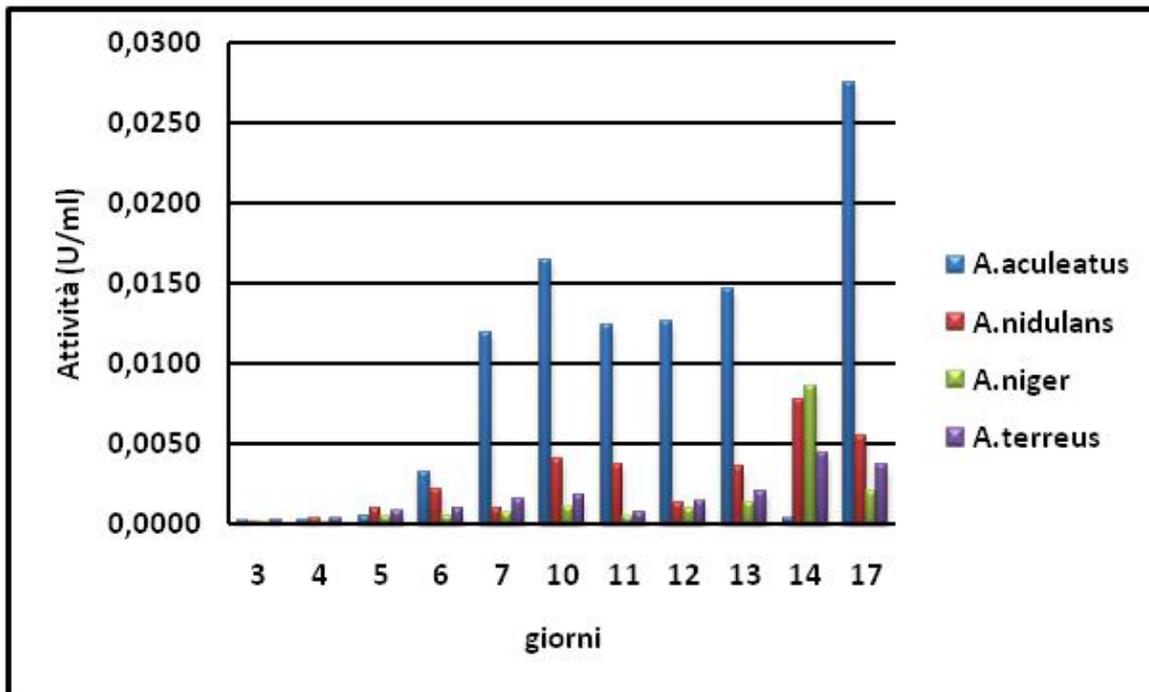


Figura 6.2 - Screening attività β-D-glucosidasi dei ceppi di *Aspergillus* in assenza di induttore.

CEPPI	GIORNI										
	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17
A. aculeatus	0,0002	0,0002	0,0005	0,0033	0,0119	0,0164	0,0125	0,0126	0,0147	0,0003	0,0276
A. nidulans	0,0002	0,0004	0,0010	0,0022	0,0010	0,0040	0,0037	0,0013	0,0036	0,0078	0,0055
A. niger	0,0002	0,0002	0,0005	0,0005	0,0007	0,0011	0,0005	0,0010	0,0014	0,0086	0,0021
A. terreus	0,0002	0,0004	0,0009	0,0010	0,0016	0,0018	0,0008	0,0014	0,0021	0,0045	0,0037

Tabella 6.2 - Dati relativi al monitoraggio dell'attività enzimatica della β-D-glucosidasi (U/ml) durante la fermentazione in assenza di induttore.

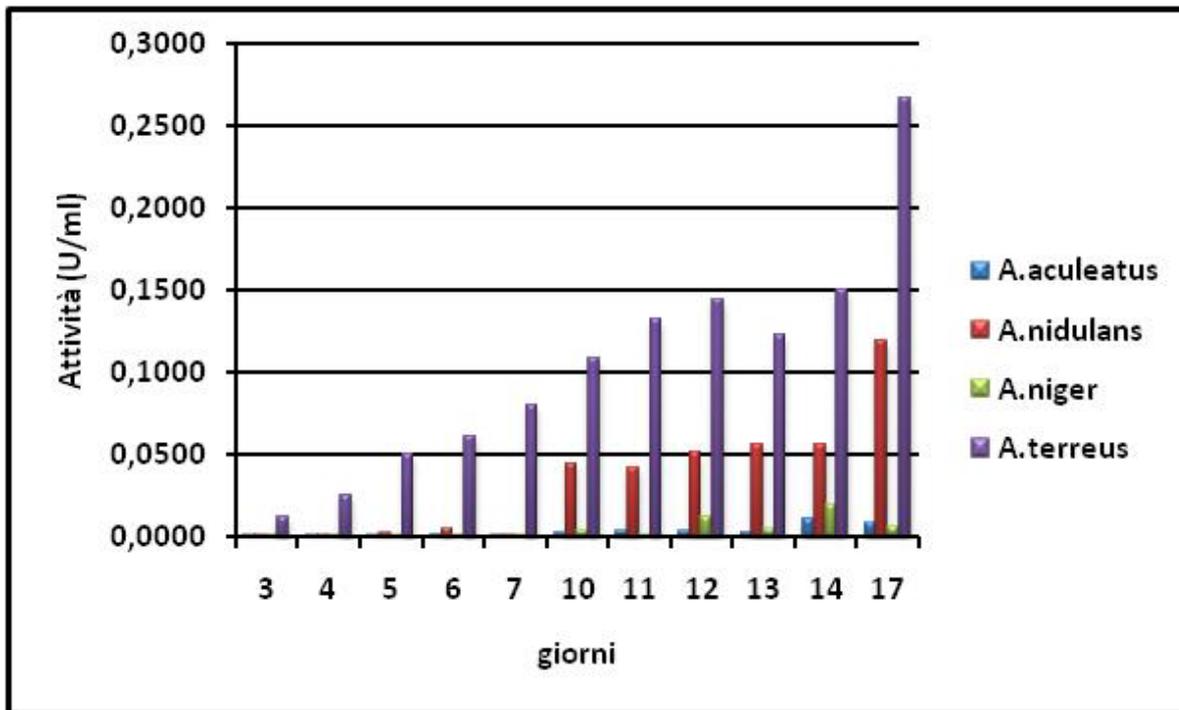


Figura 6.3 - Screening attività dell'α-L-ramnosidasi nei ceppi di *Aspergillus* in presenza di esperidina come induttore.

CEPPI	GIORNI										
	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17
A. aculeatus	0,0001	0,0001	0,0003	0,0013	0,0011	0,0025	0,0036	0,0039	0,0023	0,0114	0,0087
A. nidulans	0,0001	0,0004	0,0026	0,0051	0,0008	0,0440	0,0424	0,0511	0,0558	0,0559	0,1188
A. niger	0,0000	0,0001	0,0004	0,0007	0,0013	0,0041	0,0001	0,0124	0,0052	0,0194	0,0063
A. terreus	0,0122	0,0250	0,0506	0,0613	0,0805	0,1084	0,1325	0,1442	0,1227	0,1504	0,2670

Tabella 6.3 - Dati relativi al monitoraggio dell'attività enzimatica dell'α-L-ramnosidasi (U/ml) durante la fermentazione in presenza di esperidina come induttore.

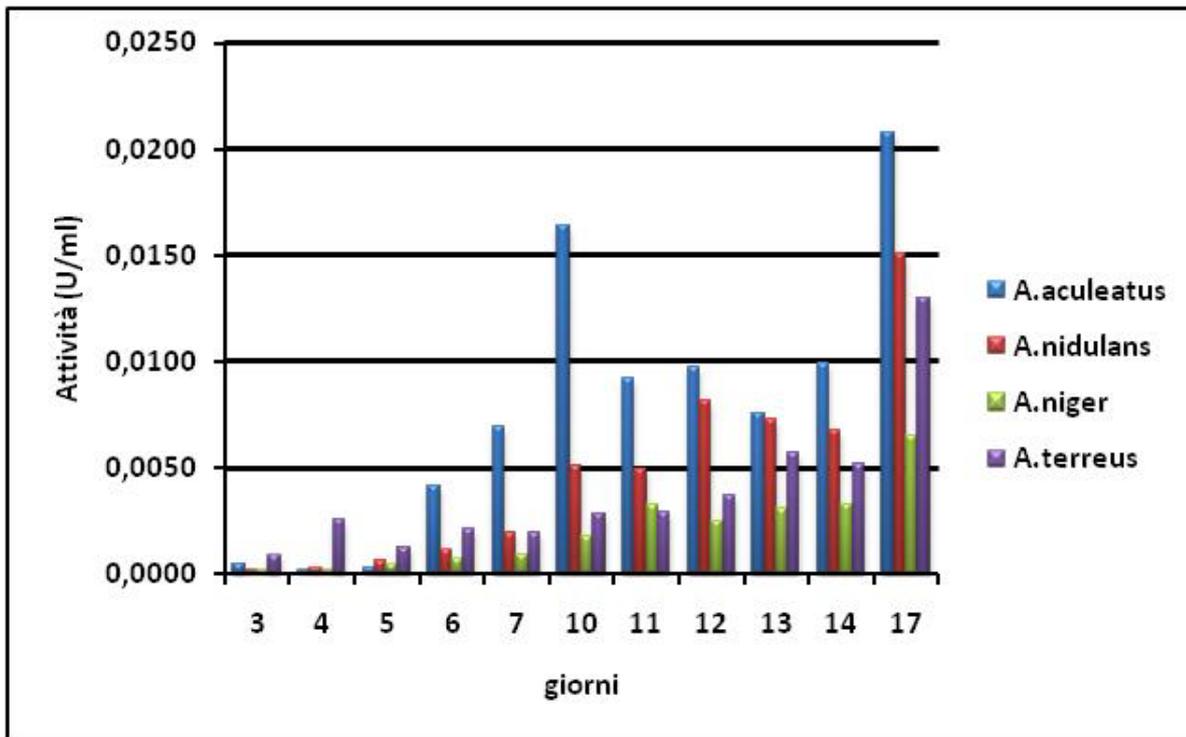


Figura 6.4 - Screening attività della β -D-glucosidasi nei ceppi di *Aspergillus* in presenza di esperidina come induttore.

CEPPI	GIORNI										
	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17
A. aculeatus	0,0005	0,0002	0,0003	0,0041	0,0069	0,0164	0,0092	0,0097	0,0075	0,0099	0,0208
A. nidulans	0,0002	0,0003	0,0007	0,0011	0,0019	0,0051	0,0049	0,0082	0,0072	0,0068	0,0150
A. niger	0,0002	0,0002	0,0004	0,0007	0,0009	0,0018	0,0032	0,0025	0,0031	0,0033	0,0065
A. terreus	0,0009	0,0026	0,0012	0,0021	0,0019	0,0028	0,0029	0,0037	0,0057	0,0051	0,0130

Tabella 6.4 - Dati relativi al monitoraggio dell'attività enzimatica della β -D-glucosidasi (U/ml) durante la fermentazione in presenza di esperidina come induttore.

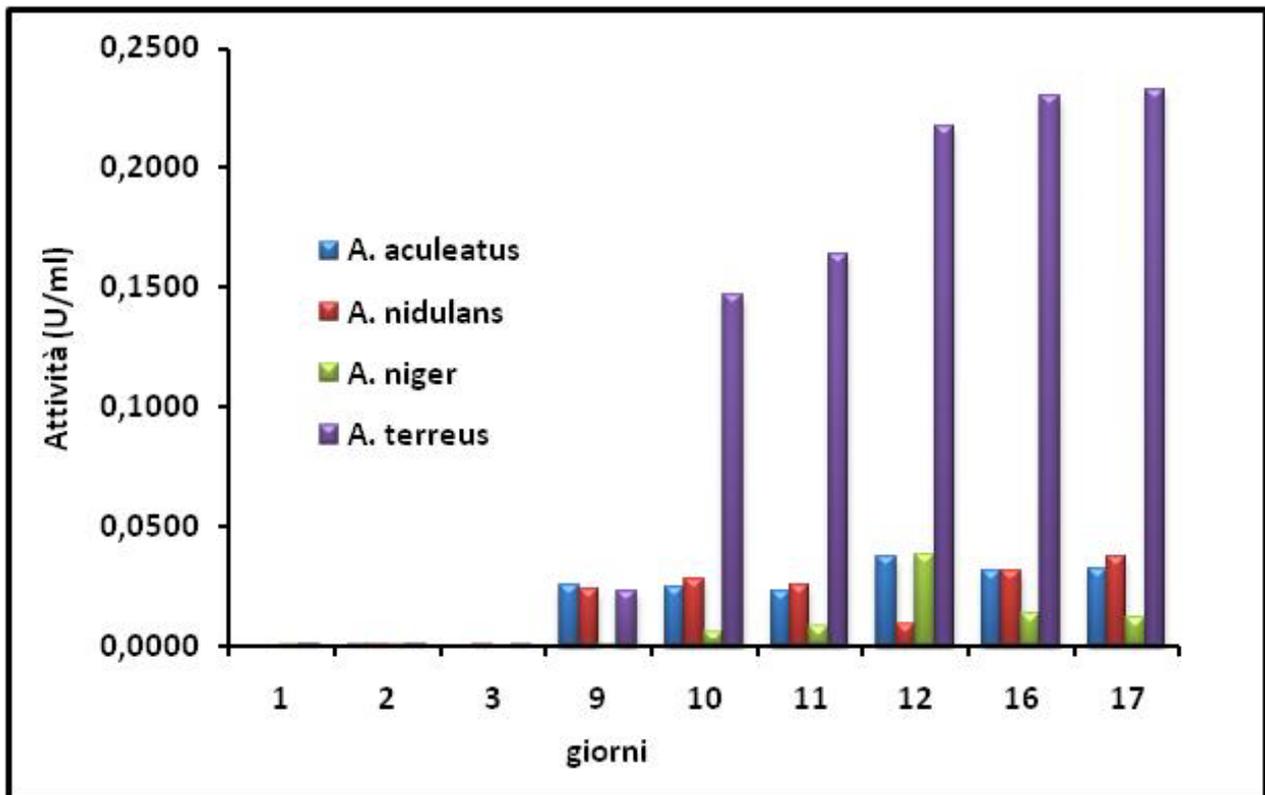


Figura 6.5 - Screening attività dell' α -L-ramnosidasi dei ceppi di *Aspergillus* in presenza di pastazzo come induttore.

CEPPI	GIORNI									
	1	2	3	9	10	11	12	16	17	
A. aculeatus	0,0000	0,0000	0,0000	0,0252	0,0249	0,0227	0,0376	0,0314	0,0319	
A. nidulans	0,0000	0,0000	0,0001	0,0235	0,0276	0,0251	0,0092	0,0313	0,0377	
A. niger	0,0007	0,0000	0,0000	0,0007	0,0059	0,0083	0,0380	0,0137	0,0120	
A. terreus	0,0011	0,0012	0,0008	0,0228	0,1465	0,1639	0,2174	0,2298	0,2327	

Tabella 6.5 - Dati relativi al monitoraggio dell'attività enzimatica dell' α -L-ramnosidasi (U/ml) durante la fermentazione in presenza di pastazzo come induttore.

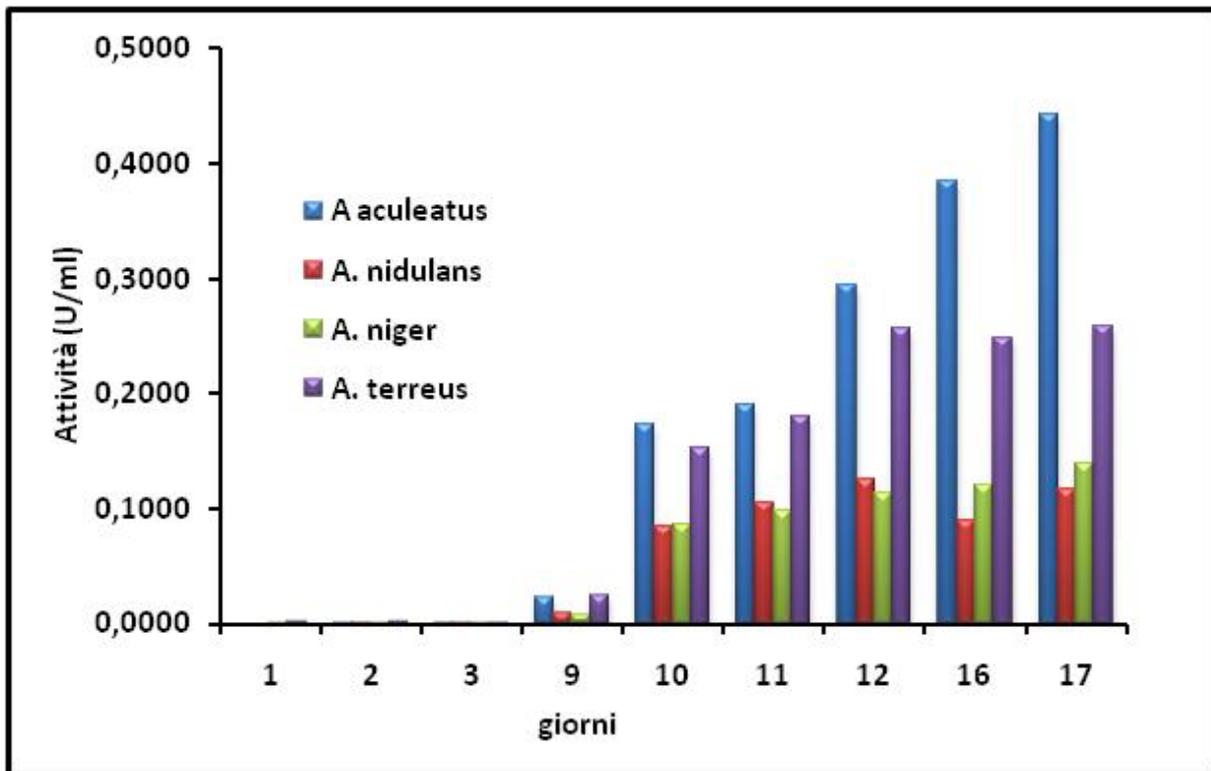


Figura 6.6 - Screening attività β -D-glucosidasi dei ceppi di *Aspergillus* in presenza di pastazzo come induttore.

CEPPI	GIORNI									
	1	2	3	9	10	11	12	16	17	
A. aculeatus	0,0000	0,0014	0,0003	0,0231	0,1734	0,1910	0,2935	0,3850	0,4429	
A. nidulans	0,0000	0,0009	0,0006	0,0094	0,0839	0,1055	0,1257	0,0901	0,1171	
A. niger	0,0018	0,0008	0,0006	0,0083	0,0855	0,0986	0,1142	0,1211	0,1383	
A. terreus	0,0022	0,0021	0,0014	0,0246	0,1521	0,1804	0,2564	0,2481	0,2592	

Figura 6.6 - Dati relativi al monitoraggio dell'attività enzimatica della β -D-glucosidasi (U/ml) durante la fermentazione in presenza di pastazzo come induttore.

6.2.1 Determinazione dei parametri cinetici V_{max} e K_m

Dai saggi effettuati variando le concentrazioni di substrato per le due diverse attività enzimatiche è stato possibile determinare la concentrazione di substrato a cui corrisponde l'attività enzimatica di saturazione, e i parametri cinetici V_{max} e K_m . L'attività a saturazione per la Rha corrisponde a 18 mM (**Fig. 6.7 e Tab. 6.7**) e per la β G a 30 mM (**Fig. 6.9 e Tab. 6.10**). Com'è possibile notare dai grafici ottenuti, entrambe le attività seguono la cinetica di *Michaelis-Menten* (**Fig. 6.7 e Fig. 6.9**), e attraverso la linearizzazione di *Lineweaver-Burk*, è stato possibile estrapolare i valori delle K_m e delle V_{max} (**Fig. 6.8 e Fig 6.10; Tab. 6.8-6.10**).

Per Rha il valore di K_m (0,52 mM), è più alto rispetto a quello riportato in letteratura per la Rha da *A. terreus* (0,17 mM) (*Gallego et al., 2001*). Questo valore della K_m potrebbe essere spiegato dalla presenza nel pastazzo di diverse sostanze che fungono da induttori, in concentrazioni non standardizzate, e che potrebbero comportare un abbassamento della specificità per il substrato, nonostante gli elevati valori di attività specifica relativa. È da sottolineare che i risultati riportati in letteratura sono relativi all'attività di enzimi purificati con metodi chimici prodotti attraverso l'impiego di un unico induttore ad elevata purezza.

6.2.2 Determinazione del pH ottimale

Per Rha da *A. terreus* il valore di pH ottimale è stato di 4.0 (**Fig. 6.11**). Per la β G si è avuto un comportamento diverso, in quanto sono stati riscontrati due valori di pH ottimale: 4.0 e 8.0 (**Fig. 6.12**). Questo risultato potrebbe essere giustificato da un cambiamento nella struttura dell'enzima stesso. Lo stesso comportamento può essere riscontrato nel caso di un isoenzima (*Andersson et al., 1990*).

6.2.3 Determinazione della temperatura ottimale

Per la Rha la temperatura ottimale è stata di 50°C come mostrato in figura (**Fig. 6.13**). Per la β G si osserva un comportamento analogo a quello avuto nella determinazione del pH, ovvero la presenza di due picchi con attività più alta: 50°C e 70°C (**Fig. 6.14**). Questo risultato avvalorava l'ipotesi della presenza di un isoenzima, fatta in precedenza.

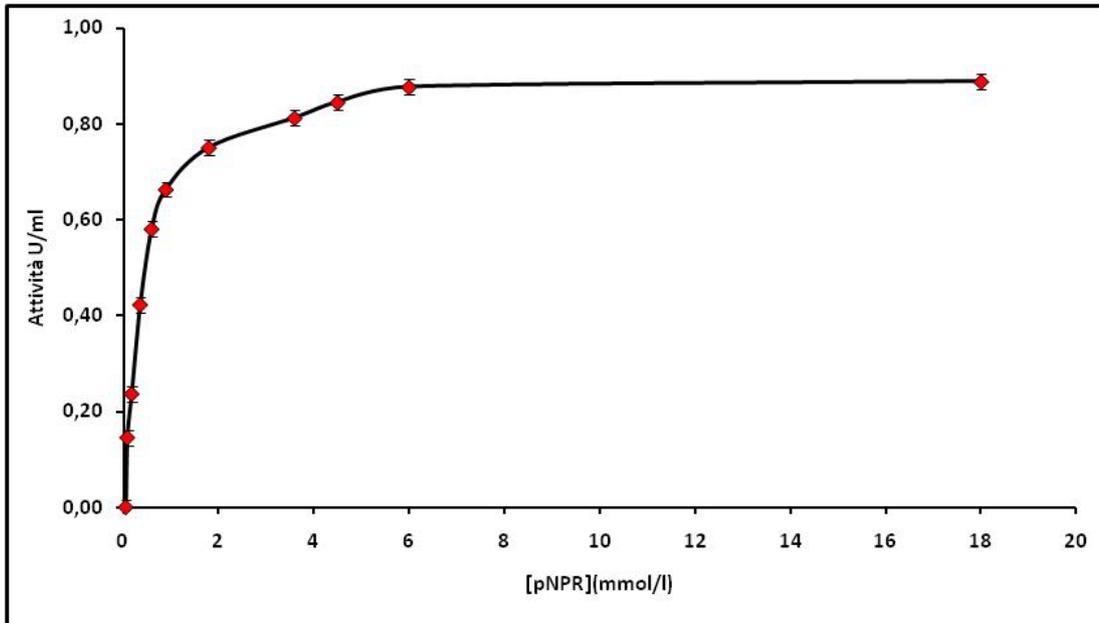


Figura 6.7 – Attività specifica relativa per α -L-ramnosidasi in funzione della concentrazione di substrato.

[pNPR](mmol)	18	6	4,5	3,6	1,8	0,9	0,6	0,36	0,18	0,09	0,06
Attività (U/mg)	0,8883	0,8767	0,8448	0,8122	0,7502	0,6630	0,5805	0,4228	0,2365	0,1454	0

Tabella 6.7 - Dati dell'attività specifica relativa per α -L-ramnosidasi in funzione della concentrazione di substrato.

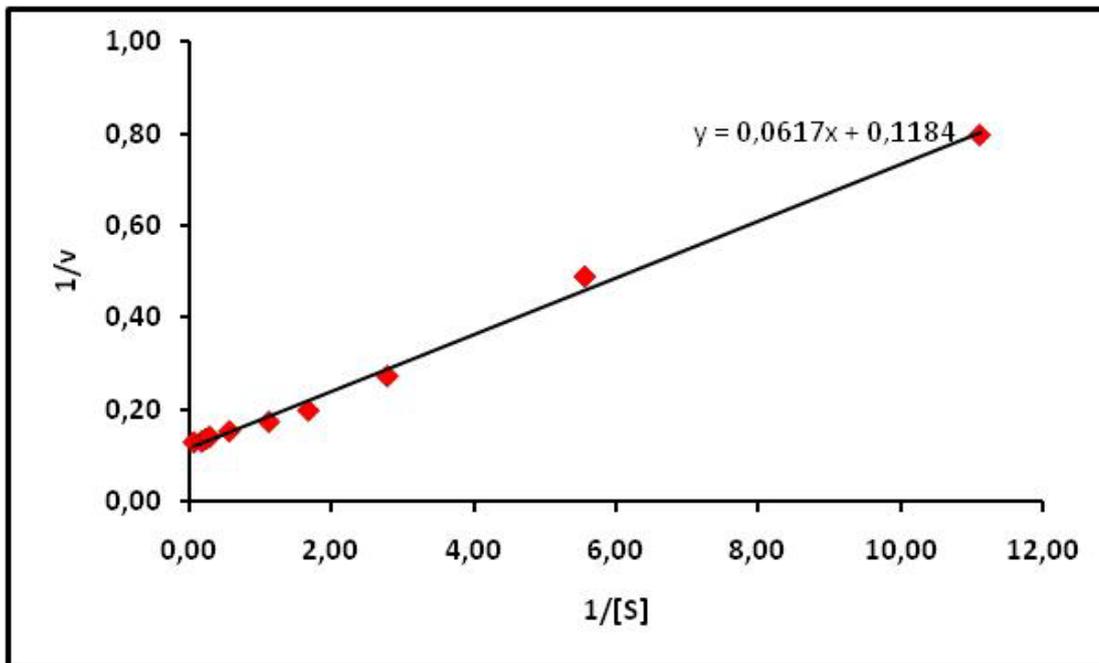


Figura 6.8 - Linearizzazione di Lineweaver-Burk per l' α -L-ramnosidasi.

1/S	0,06	0,17	0,22	0,28	0,56	1,11	1,67	2,78	5,56	11,11
1/v	0,13	0,13	0,14	0,14	0,15	0,17	0,20	0,27	0,49	0,80

Tabella 6.8 - Valori di $1/[S]$ e di $1/v$ per l'estrapolazione matematica dei valori di v_{\max} e K_m per l' α -L-ramnosidasi.

v_{\max}	8,45
k_m	0,52

Tabella 6.9 - Valori delle costanti cinetiche (v_{\max} e K_m) per l' α -L-ramnosidasi.

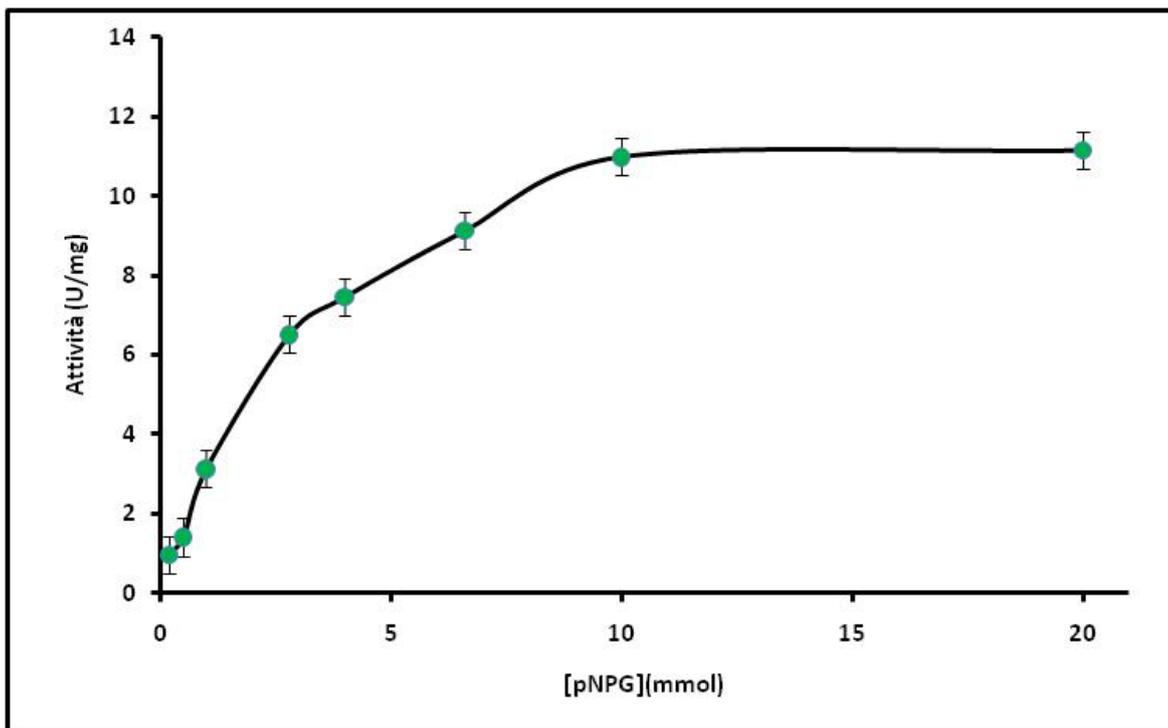


Figura 6.10 - Attività specifica relativa per β -D-glucosidasi in funzione della concentrazione di substrato.

pNPG (mmol)	20	10	6,6	4	2,8	1	0,5	0,2
Attività (U/mg)	11,15	10,99	9,12	7,45	6,51	3,13	1,41	0,97

Tabella 6.10 - Dati dell'attività specifica relativa per la β -D-glucosidasi in funzione della concentrazione di substrato.

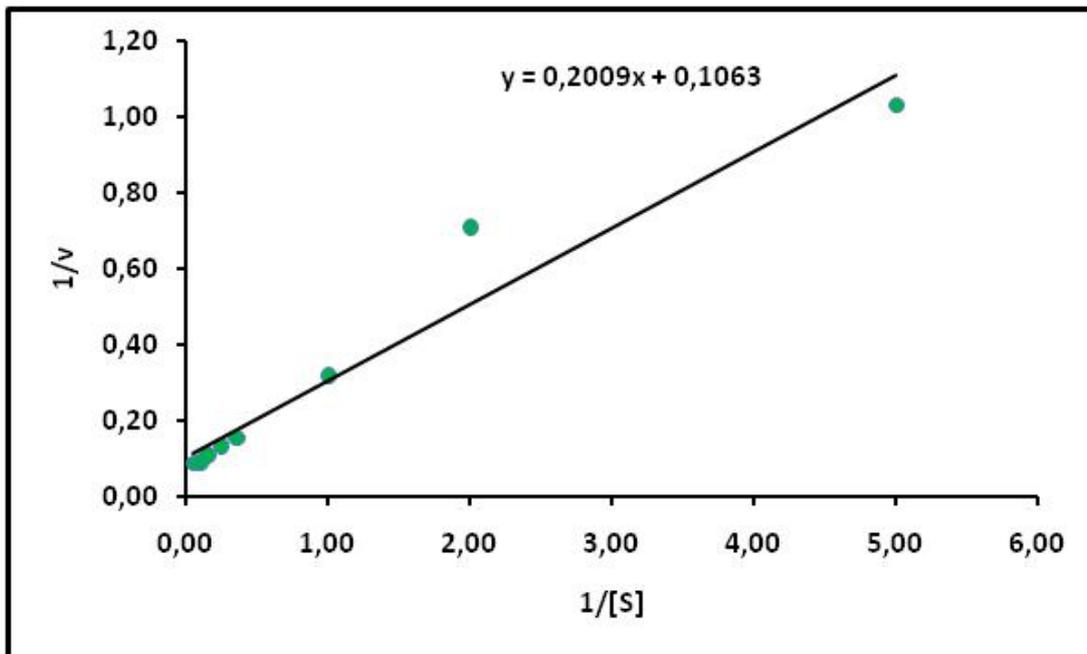


Figura 6.11 - Linearizzazione di Lineweaver-Burk per la β -D-glucosidasi.

1/S	0,05	0,10	0,15	0,25	0,36	1,00	2,00	5,00
1/v	0,09	0,09	0,11	0,13	0,15	0,32	0,71	1,03

Tabella 6.11 - Valori di $1/[S]$ e di $1/v$ per l'estrapolazione matematica dei valori di v_{\max} e K_m per la β -D-glucosidasi.

v_{\max}	9,41
K_m	1,89

Tabella 6.12 - Valori delle costanti cinetiche (v_{\max} e K_m) per la β -D-glicosidasi.

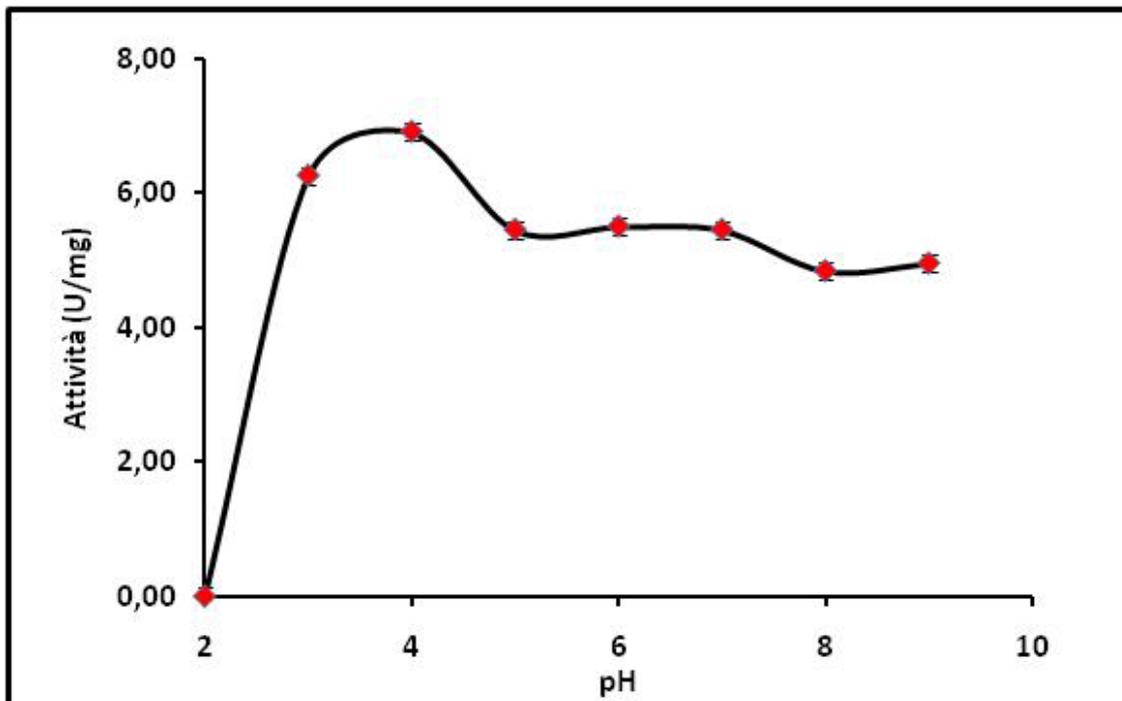


Figura 6.11 – Attività specifica relativa per l'α-L-rannosidasi in funzione del pH.

pH	2	3	4	5	6	7	8	9
Attività (U/mg)	0,00	6,26	6,91	5,45	5,50	5,45	4,84	4,95

Tabella 6.13 - Dati dell'attività specifica per l'α-L-rannosidasi in funzione del pH.

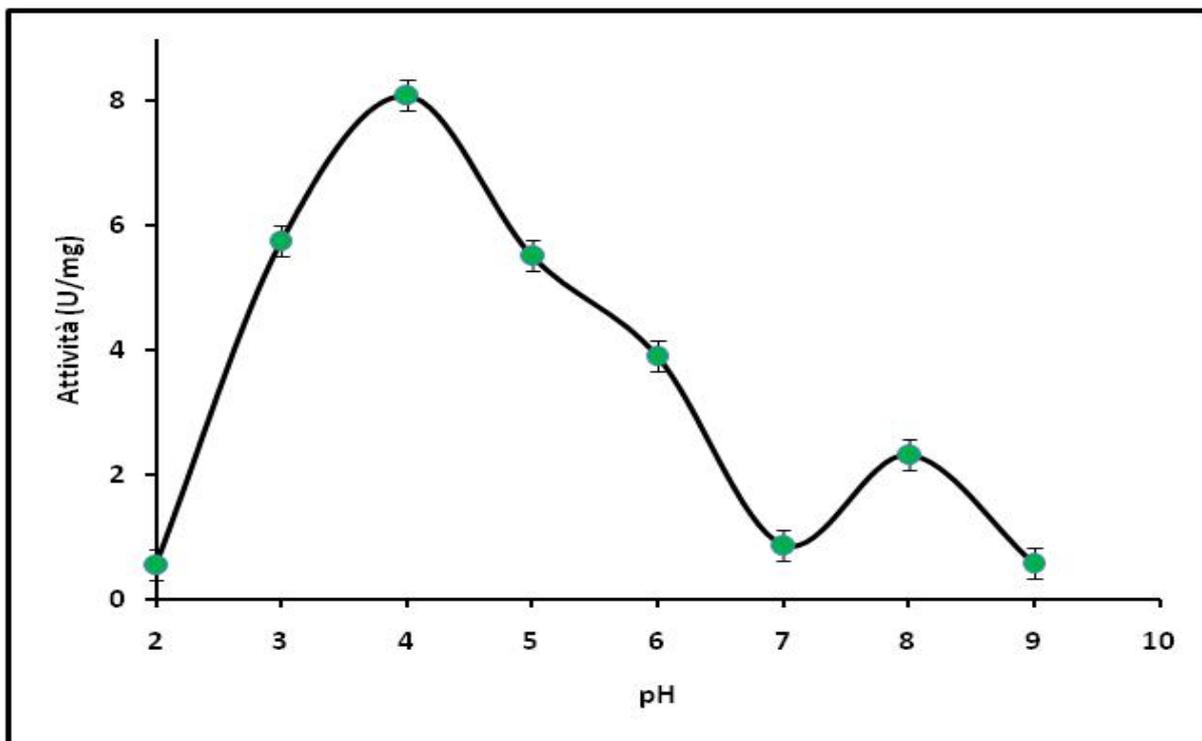


Figura 6.12 - Attività specifica relativa in funzione per la β -D-glucosidasi in funzione del pH.

pH	2	3	4	5	6	7	8	9
Attività (U/mg)	0,55	5,75	8,09	5,51	3,90	0,87	2,31	0,57

Tabella 6.14 - Dati dell'attività specifica relativa per la β -D-glucosidasi in funzione del pH.

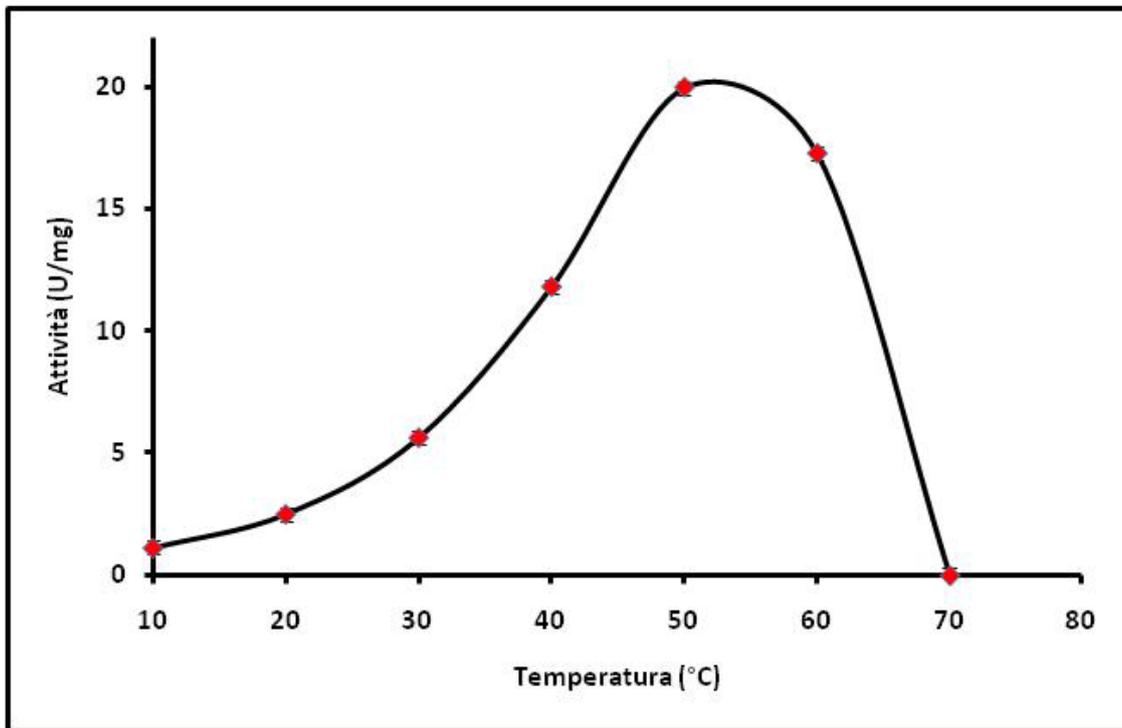


Figura 6.13 - Attività specifica relativa per l' α -L-ramnosidasi in funzione della temperatura.

Temperatura (°C)	10	20	30	40	50	60	70
Attività (U/mg)	1,12	2,50	5,63	11,80	19,95	17,25	0,00

Tabella 6.15 - Dati dell'attività specifica relativa per l' α -L-ramnosidasi in funzione della temperatura.

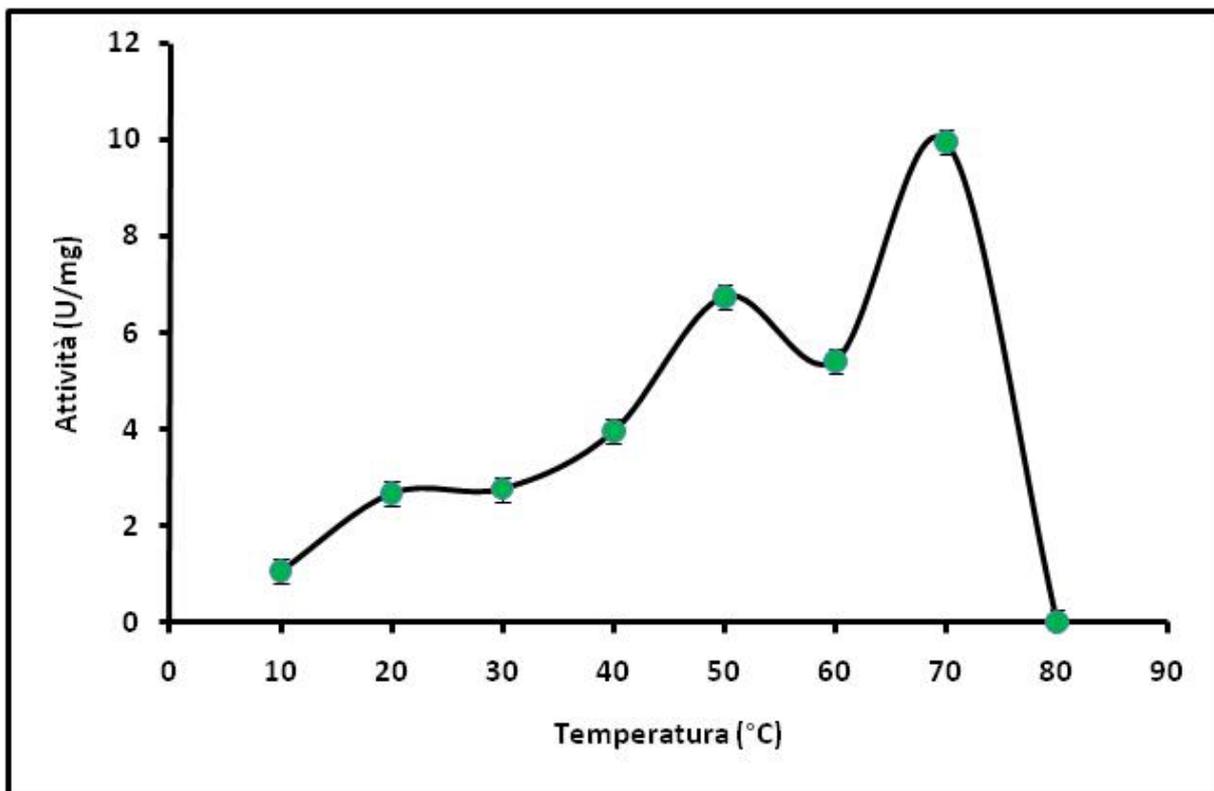


Figura 6.14 - Attività specifica relativa per la β -D-glucosidasi in funzione della temperatura.

Temperatura (°C)	10	20	30	40	50	60	70	80
Attività (U/mg)	1,07	2,67	2,77	3,96	6,76	5,43	9,96	0,00

Tabella 6.16 - Dati dell'attività specifica per la β -D-glucosidasi in funzione della temperatura.

6.2.4 Stabilità enzimatica in condizioni ottimali

Queste prove hanno permesso di osservare il comportamento dell'attività -L-ramnosidasica e β -D-glucosidasica in condizioni ottimali: temperatura 50°C e pH 4.0 (**Fig. 6.15**).

Dal grafico è possibile osservare che la Rha è stabile in tali condizioni poiché dopo 8 gg di incubazione si ha un decremento di circa il 40% dell'attività specifica. La β G ha, invece, un comportamento totalmente diverso; anche presentando un'attività iniziale più alta rispetto alla Rha, l'attività si abbassa del 47% già dopo poche ore di incubazione. Nei giorni successivi mostra però una diminuzione di attività proporzionale nel tempo. Dopo 8 gg l'attività della β G si abbassa fino al 31%, mentre la Rha mantiene la sua attività per il 60%.

6.2.5 Inibizioni da zucchero e acido ascorbico

Le prove di inibizione condotte sono di tipo qualitativo e non quantitativo. Dai risultati si può vedere che gli enzimi hanno un comportamento diverso per lo stesso inibitore.

- 6.2.5.1 Inibizione da glucosio

In presenza di glucosio entrambi gli enzimi risultano inibiti, ma in maniera diversa. L'attività specifica relativa della Rha si riduce del 50% per elevate concentrazioni di zucchero, 25% (1,5 M) (**Fig. 6.16**), invece la β G mostra un abbassamento del 50% dell'attività specifica relativa già allo 0,8% ($4 \cdot 10^{-2}$ M) di concentrazione zuccherina (**Fig. 6.17**). La concentrazione di glucosio a cui corrisponde l'attività minima è 25% di inibitore per la β G e 72% per la Rha.

- 6.2.5.2 Inibizione da fruttosio

Anche in presenza di fruttosio gli enzimi risultano inibiti in modo diverso. L'attività specifica della Rha si abbassa al 75% a concentrazioni di zucchero del 5% circa (**Fig. 6.18**), invece la β G mostra un abbassamento di attività del 50% già allo 0,8% di fruttosio (**Fig. 6.19**).

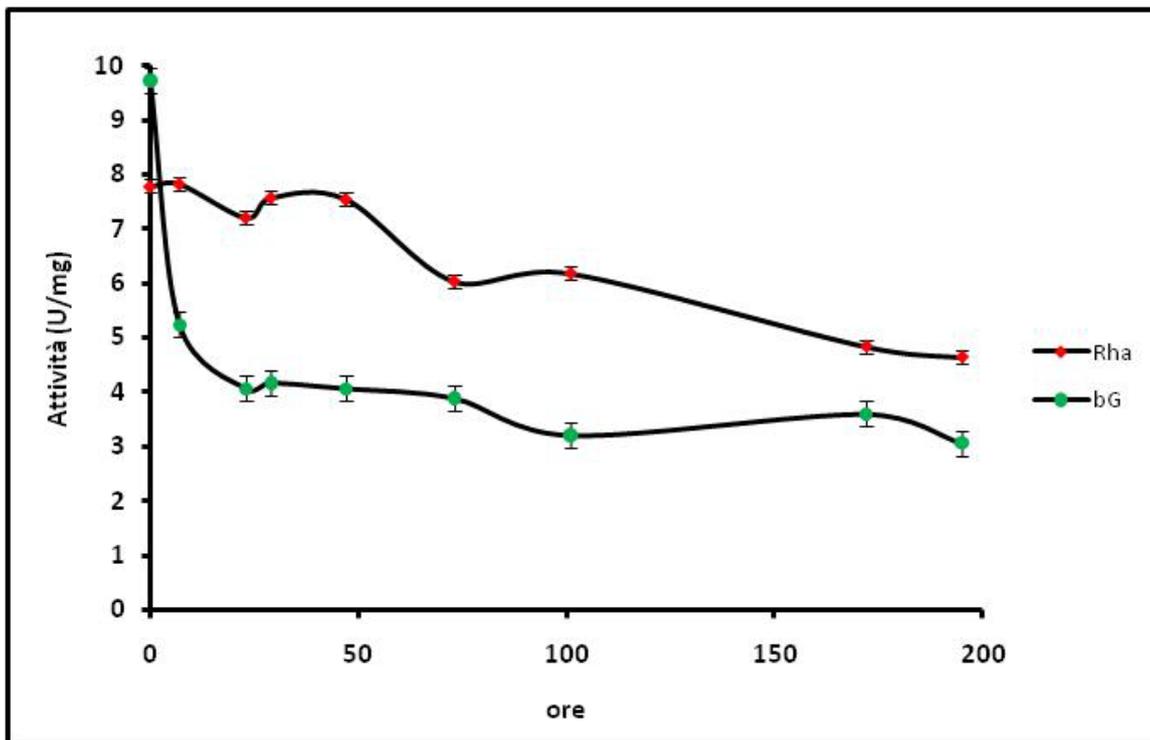


Figura 6.15 - Attività specifica relativa riferita alla stabilità per l' α -L-ramnosidasi e per la β -D- glucosidasi a 50 °C e pH 4.0.

	<u>ORE</u>									
<u>ENZIMA</u>	0	7	23	29	47	73	101	172	195	
Rha	7,79	7,83	7,21	7,58	7,55	6,04	6,19	4,84	4,65	
bG	9,73	5,24	4,07	4,17	4,07	3,89	3,21	3,60	3,06	

Tabella 6.17 - Dati dell'attività specifica relativa riferita alla stabilità (Attività U/mg) per l' α -L-ramnosidasi e per la β -D-glucosidasi a 50 °C e pH 4.0.

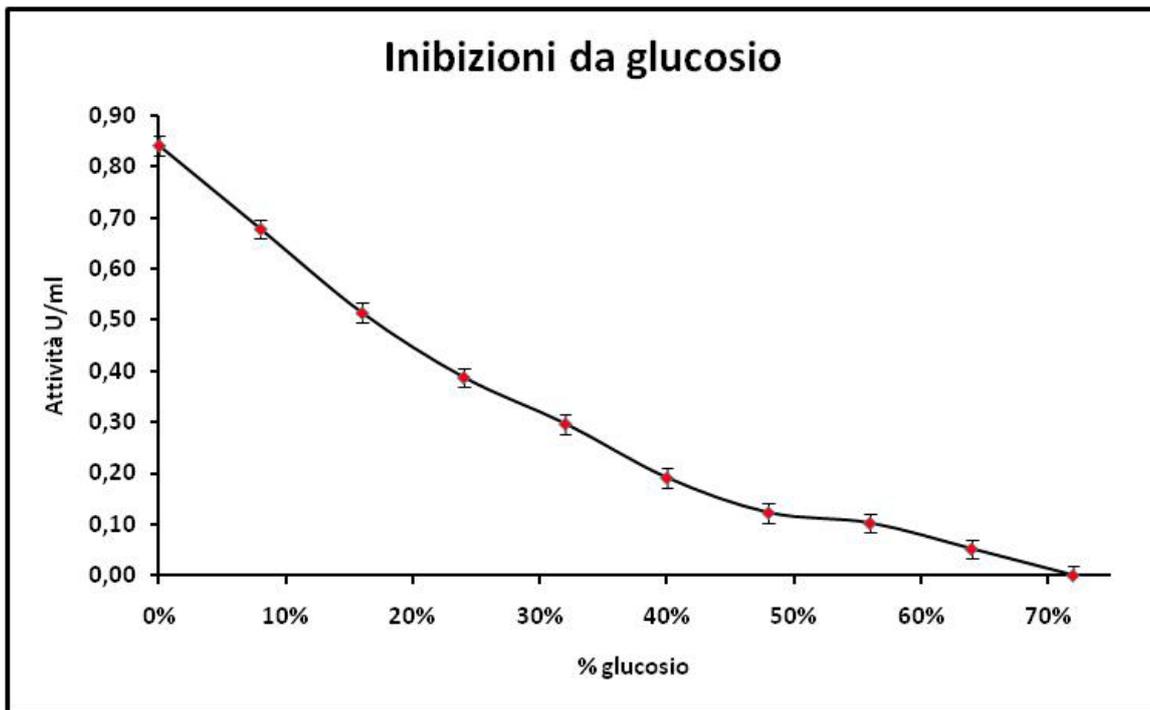


Figura 6.16 - Attività specifica relativa per l' α -L-ramnosidasi in funzione della concentrazione di glucosio.

% glucosio	0%	8%	16%	24%	32%	40%	48%	56%	64%	72%
Attività (U/mg)	0,84	0,68	0,51	0,39	0,30	0,19	0,12	0,10	0,05	0,00

Tabella 6.18 - Dati dell'attività specifica per α -L-ramnosidasi in funzione della concentrazione di glucosio.

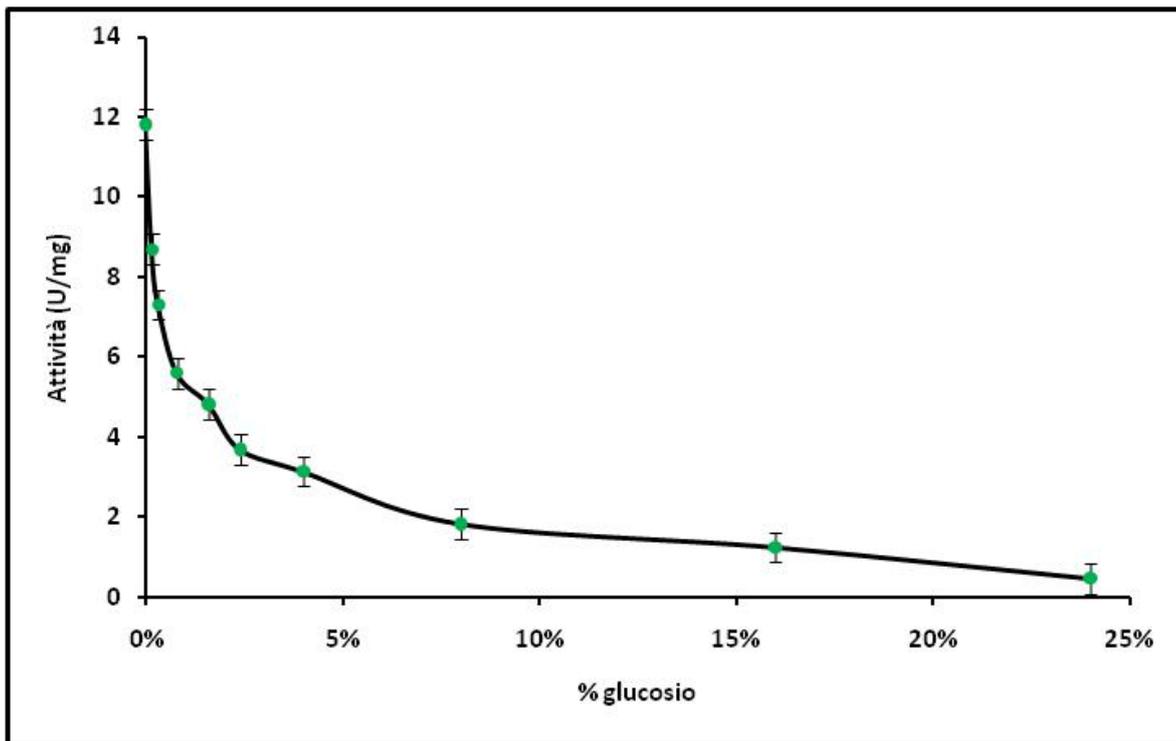


Figura 6.17 – Attività specifica relativa per β -D-glucosidasi in funzione della concentrazione di glucosio.

% glucosio	0%	0,16%	0,32%	0,80%	1,60%	2,40%	4,00%	8%	16%	24%
Attività (U/mg)	11,82	8,70	7,31	5,60	4,83	3,69	3,14	1,84	1,25	0,47

Tabella 6.19 - Dati dell'attività specifica relativa per la β -D-glucosidasi in funzione della concentrazione di glucosio.

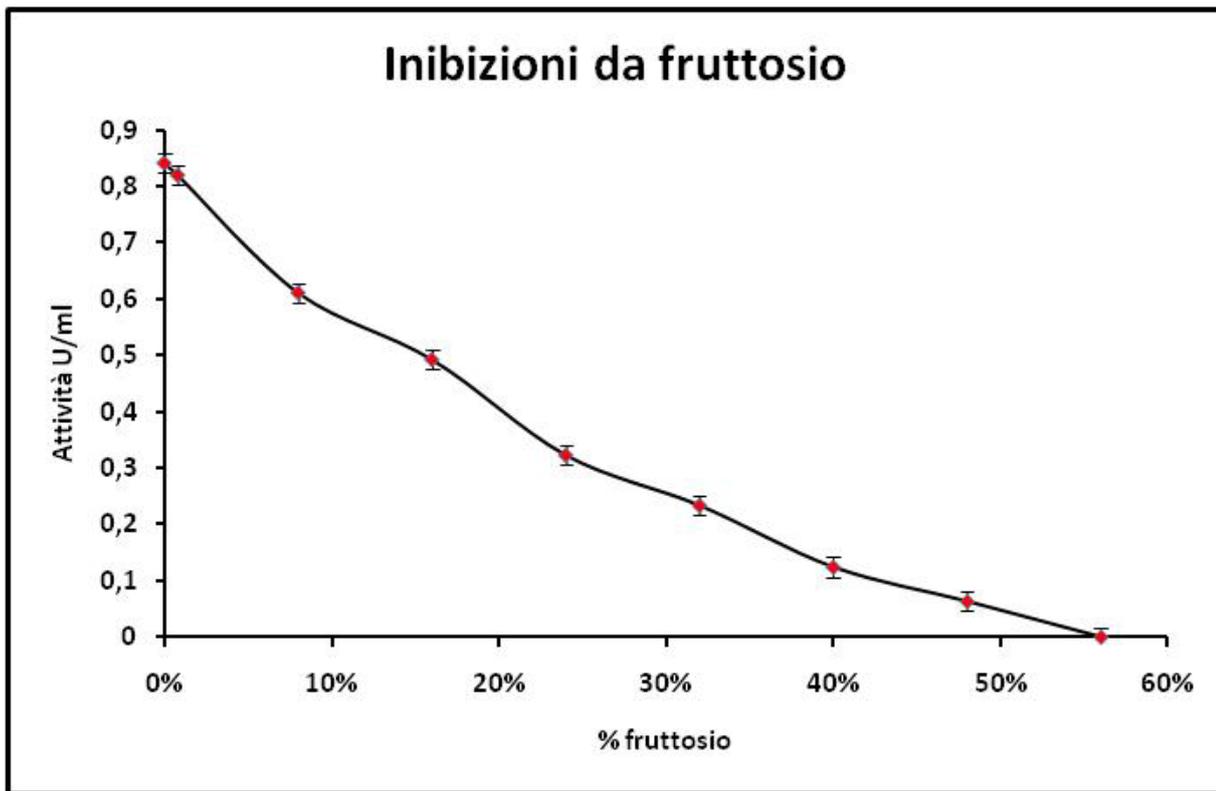


Figura 6.18 - Attività specifica relativa per α -L-ramnosidasi in funzione della concentrazione di fruttosio.

% fruttosio	0%	0,80%	8%	16%	24%	32%	40%	48%	56%
Attività (U/mg)	0,84	0,82	0,61	0,49	0,32	0,23	0,12	0,06	0,00

Tabella 6.20 - Dati dell'attività specifica per α -L-ramnosidasi in funzione della concentrazione di fruttosio.

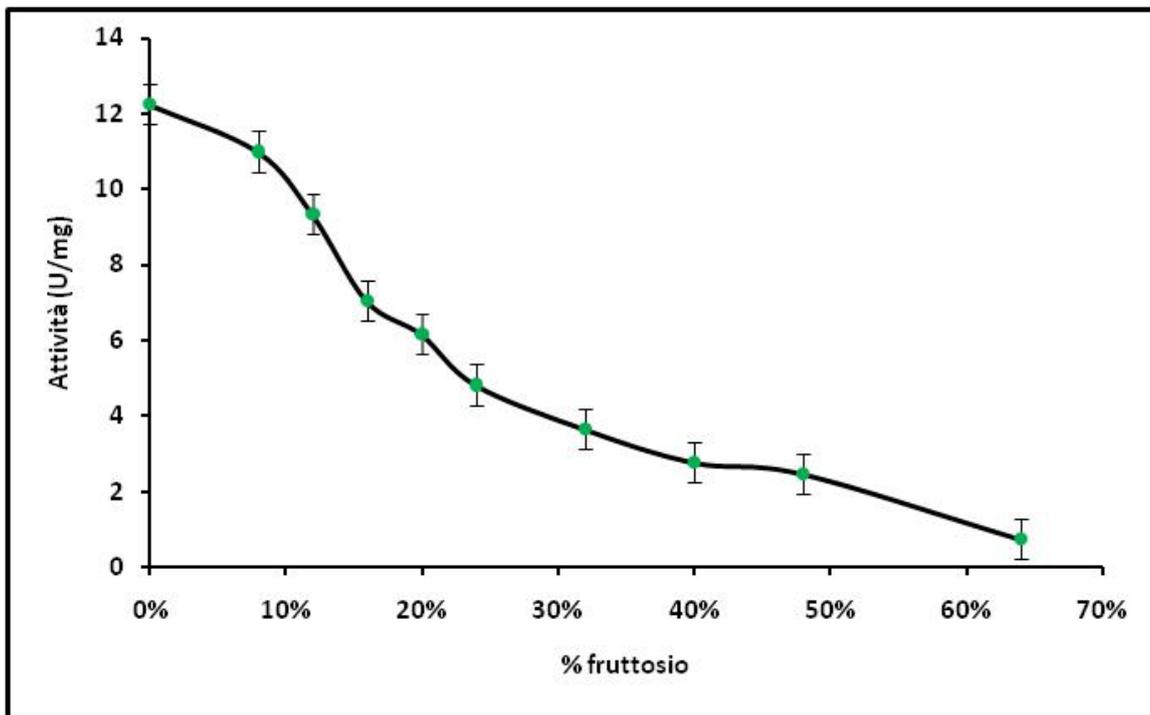


Figura 6.19 - Attività specifica relativa per β -D-glucosidasi in funzione della concentrazione di fruttosio.

% fruttosio	0%	8%	12%	16%	20%	24%	32%	40%	48%	64%
Attività (U/mg)	12,25	11,00	9,34	7,05	6,17	4,82	3,65	2,77	2,47	0,74

Tabella 6.21 - Dati dell'attività specifica relativa per β -D-glucosidasi in funzione della concentrazione di fruttosio.

- *6.2.5.3 Inibizione da ramnosio*

In presenza di L-ramnosio, l'attività della Rha si abbassa del 95% a basse concentrazioni di zucchero, 2.0% (**Fig. 6.20**), mentre la β G risulta inibita ad elevate concentrazioni di zucchero (**Fig. 6.21**). Concentrazioni superiori al 70% non sono state saggiate per la β G, poiché tale zucchero precipita ad elevate concentrazioni.

- *6.2.5.4 Inibizione da acido ascorbico*

Entrambi gli enzimi risultano inibiti da acido ascorbico. Il repentino abbassamento dell'attività specifica relativa si ha per concentrazioni di acido ascorbico dell'1%, e risultano completamente inibiti a concentrazioni pari a circa il 3% di acido (**Fig. 6.22** e **Fig. 6.23**).

6.2.6 Purificazione

Un problema frequente che si riscontra nell'utilizzazione della Rha è la separazione dalla β G. A tale scopo, numerosi autori hanno utilizzato diverse tecniche cromatografiche normalmente impiegate nella purificazione di proteine: scambio ionico, gel filtration, sephadex e sepharose. Essendo l'obiettivo del presente lavoro, il possibile utilizzo della Rha nei processi alimentari industriali, è stata messa a punto una purificazione basata sull'impiego di supporti ad impatto economico relativamente basso, ma al tempo Food safe. Sono stati utilizzati il chitosano, organico, e la bentonite e l'allumina, inorganici. Tutti sono stati testati a diversi valori di pH, allo scopo di immobilizzare uno dei due enzimi sul supporto, sfruttando il diverso punto isoelettrico. Questi tentativi di purificazione non hanno avuto alcun successo nel separare i due enzimi. Infatti saggiando le attività enzimatiche sul supporto e sul surnatante, è stato verificato che i due enzimi venivano entrambi trattenuti dal supporto o entrambi rimanevano nel surnatante.

I risultati delle prove di purificazione fanno ipotizzare che il metabolita prodotto dalla fermentazione è un'esperidinasi, ovvero un complesso enzimatico entrambe le attività enzimatiche che agiscono contemporaneamente.

Dato che non è stato possibile separare le due attività attraverso l'immobilizzazione e data l'elevata stabilità della Rha ad alte temperature e alti valori di pH, si è tentato di

separare la β G tramite inattivazione termica. L'attività β -glucosidasi è quasi azzerata, e la Rha ha conservato l'80% della sua attività.

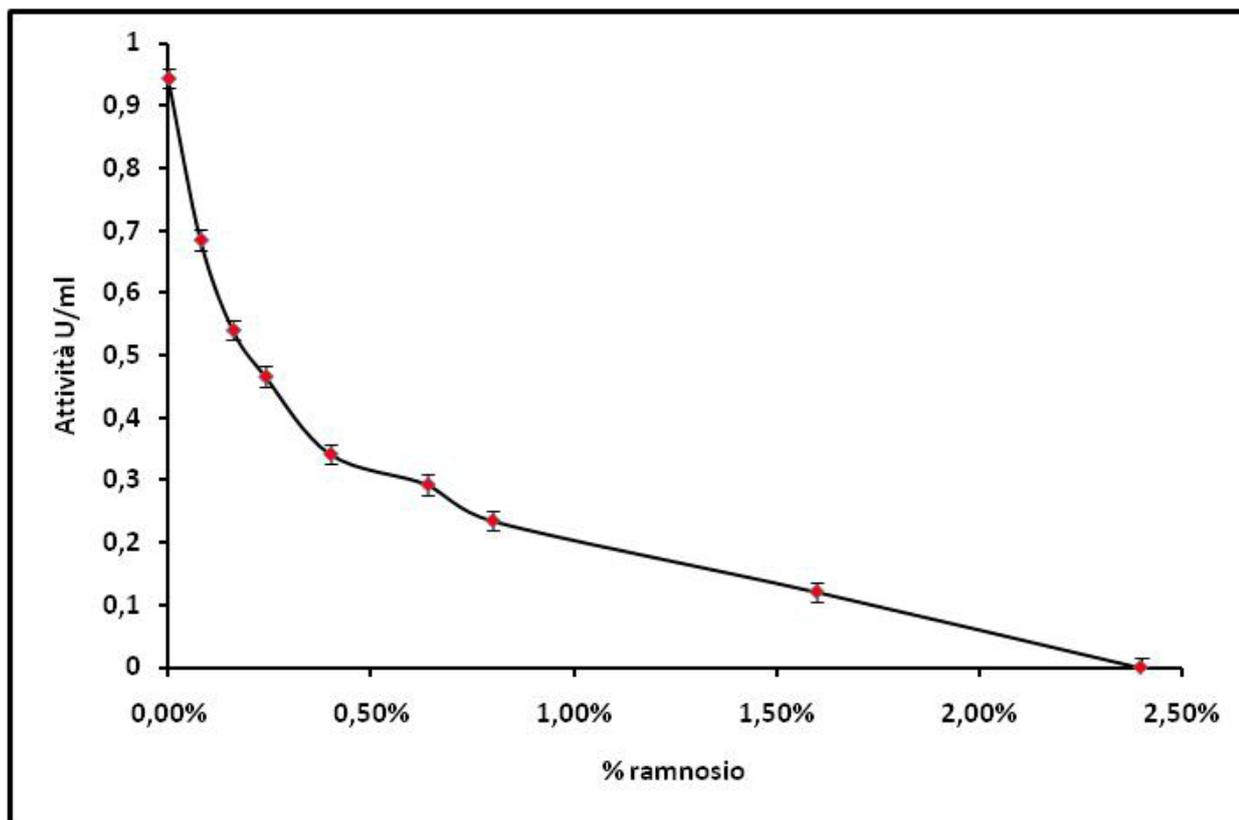


Figura 6.20 - Attività specifica relativa per l' α -L-ramnosidasi in funzione della concentrazione di L-ramnosio.

% ramnosio	0%	0,08%	0,16%	0,24%	0,40%	0,64%	0,80%	1,60%	2,40%
Attività (U/mg)	0,94	0,69	0,54	0,47	0,34	0,29	0,24	0,12	0,00

Tabella 6.22 - Dati dell'attività specifica per l' α -L-ramnosidasi in funzione della concentrazione di L-ramnosio.

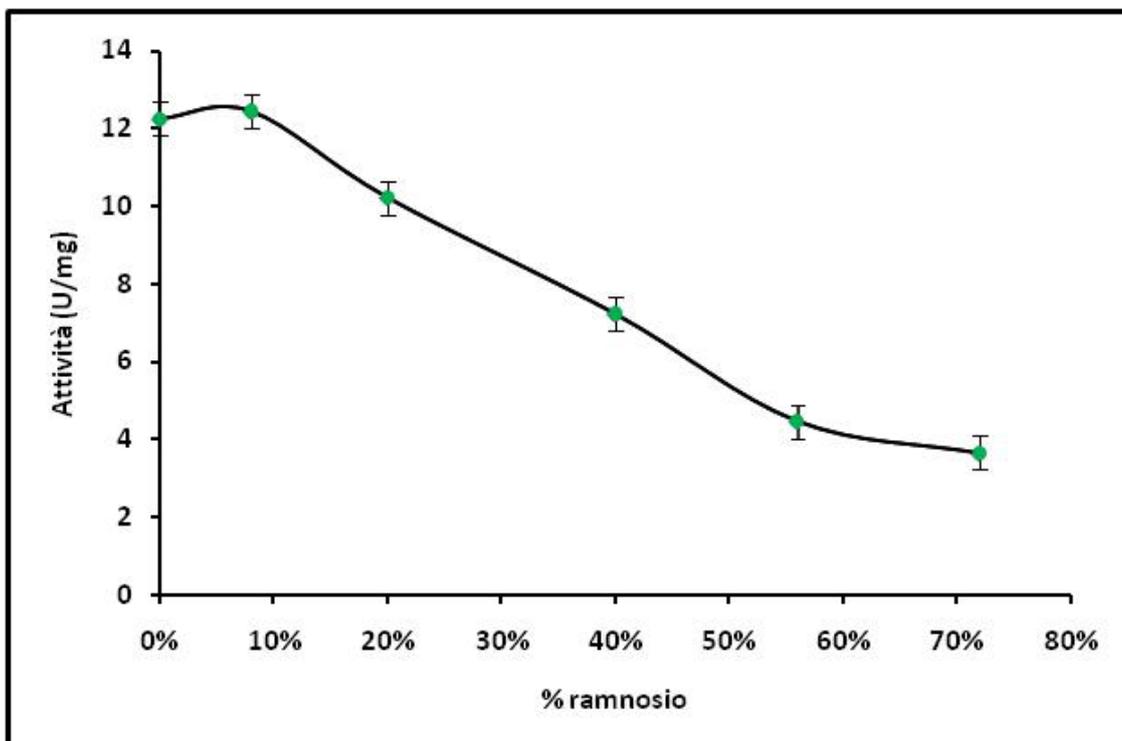


Figura 6.21 - Attività specifica relativa per la β -D-glucosidasi in funzione della concentrazione di L-ramnosio.

% ramnosio	0%	8%	20%	40%	56%	72%
Attività (U/mg)	12,25	12,45	10,22	7,23	4,47	3,65

Tabella 6.23 - Dati dell'attività specifica relativa per la β -D-glucosidasi in funzione della concentrazione di L-ramnosio.

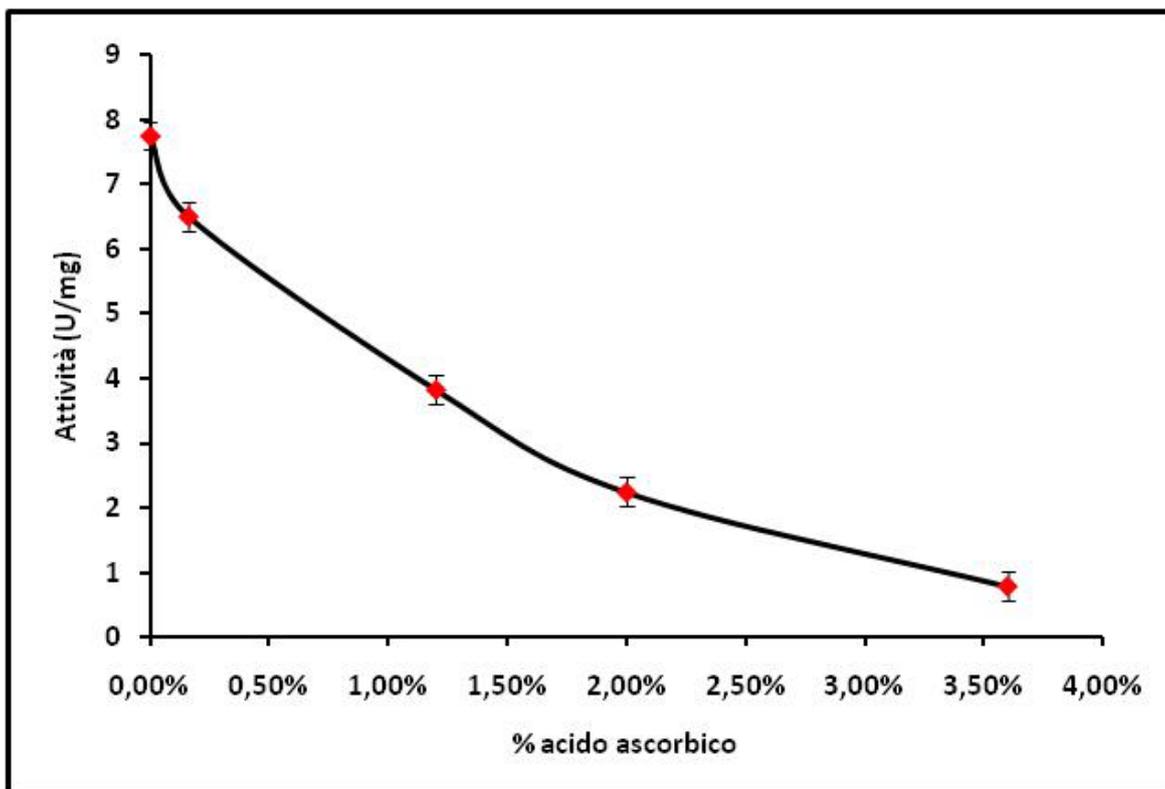


Figura 6.22 - Attività specifica relativa per d' -L-ramnosidasi in funzione della concentrazione di acido ascorbico.

% acido ascorbico	0%	0,16%	1,20%	2,00%	3,60%
Attività (U/mg)	7,75	6,51	3,83	2,25	0,79

Tabella 6.24 - Dati dell'attività specifica per d' -L-ramnosidasi in funzione della concentrazione di acido ascorbico.

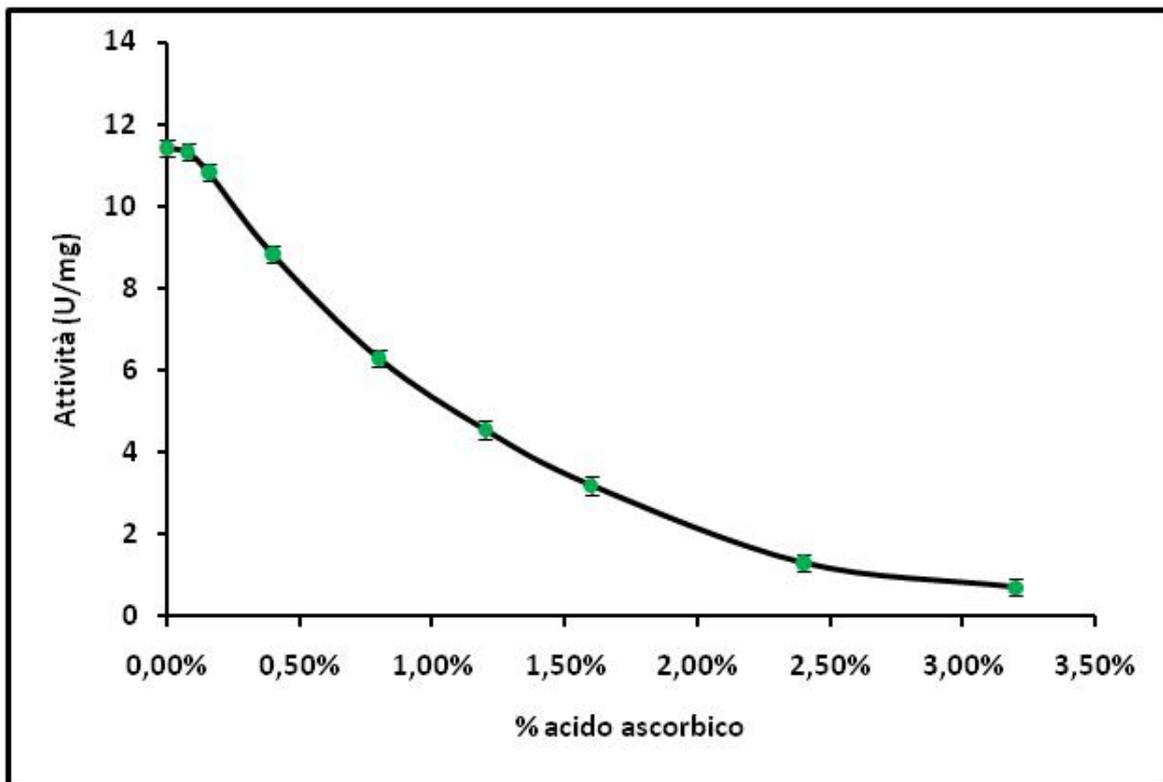


Figura 6.23 - Attività specifica relativa per la β -D-glucosidasi in funzione della concentrazione di acido ascorbico.

% acido ascorbico	0%	0,08%	0,16%	0,40%	0,80%	1,20%	1,60%	2,40%	3,20%
Attività (U/mg)	11,41	11,32	10,82	8,83	6,30	4,55	3,20	1,30	0,71

Tabella 6.25 - Dati dell'attività specifica relativa per la β -D-glucosidasi in funzione della concentrazione di acido ascorbico.

Dai risultati ottenuti si è visto che per bassi valori di pH, quindi in ambiente acido, si ha una separazione della β -D-glucosidasi dalla α -L-ramnosidasi, infatti in queste condizioni la β -D-glucosidasi mantiene la sua attività per il 90%, mentre l' α -L-ramnosidasi perde quasi totalmente la sua attività.

I metodi dell'inattivazione termica e dell'inattivazione acida non permettono di separare le due glicosidasi, ma consentono di utilizzare un enzima senza l'interferenza dell'altro.

6.2.7 Immobilizzazione

Diversi metodi di immobilizzazione sono stati testati, "legame covalente", "adsorbimento", "entrapment" e "microincapsulazione". La tecnica del legame covalente è stata condotta su una resina epossidica, l'Eupergit C, su cui è stata immobilizzata con successo la β -glucosidasi (Tu et al, 2006). L'entrapment è stato condotto con la tecnica sol-gel: la soluzione è stata mantenuta a contatto con una fonte di silice (TMOS) per diverse ore, la quale polimerizzando, intrappolava l'enzima in maniera random. La tecnica della microincapsulazione, oltre alla fonte di silice (TMOS), sono stati utilizzati dei surfattanti (P127 o CTMABr), allo scopo di realizzare delle strutture ordinate (OMM) intorno all'enzima.

Queste tecniche non hanno permesso di immobilizzare con successo i due enzimi, in quanto si verificava una perdita completa dell'attività o non si aveva nessuna percentuale di immobilizzazione.

La tecnica dell'assorbimento su silice MS3030 ha dato i migliori risultati. In seguito all'immobilizzazione i due enzimi mantengono la propria attività per il 50%. La silice è stata conservata a 4°C ed è stata verificata la stabilità degli enzimi immobilizzati nei giorni successivi. Dalla figura **6.24** si può notare che l'attività enzimatica diminuisce gradualmente nei cinque giorni successivi.

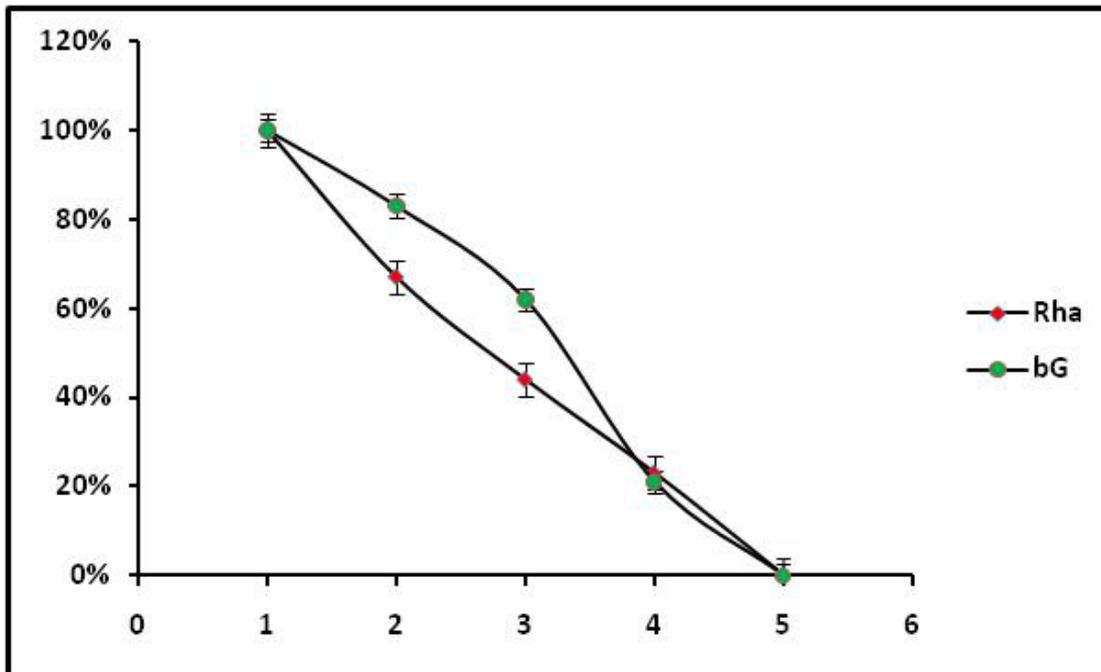


Figura 6.24 - Stabilità dell' α -L-ramnosidasi e della β -D-glucosidasi immobilizzate su silice MS3030.

	1	2	3	4	5
Rha	100%	67%	44%	23%	0%
bG	100%	83%	62%	21%	0%

Tabella 6.26 - Valori percentuali dell'attività dell' α -L-ramnosidasi e della β -D-glucosidasi immobilizzate su silice MS3030.

7. Conclusioni e obiettivi futuri

Dallo screening effettuato sui quattro ceppi di *Aspergillus* è stato selezionato il miglior produttore di α -L-ramnosidasi impiegando come induttore il pastazzo d'agrumi. Tale risultato è stato quantificato in termini di attività relativa (U/ml) e paragonato a quello ottenuto utilizzando come induttore esperidina. Dai risultati ottenuti si riscontra che il miglior ceppo è l'*Aspergillus terreus*, poiché presenta attività α -L-ramnosidasica più alta, e i valori ottenuti in presenza di esperidina o pastazzo sono quasi coincidenti (0,27 vs 0,23 U/ml). Inoltre, i valori di pH e temperatura ottenuti dalla caratterizzazione chimico-fisica rientrano nel range di valori riportati in letteratura.

Dalla caratterizzazione di netrambe le attività enzimatiche α -L-ramnosidasica e β -D-glucosidasica sono emersi risultati interessanti per una futura applicazione nell'industria delle bevande, in particolare per la produzione di succhi di frutta.

Essendo un sottoprodotto di scarto, l'utilizzo del pastazzo, come induttore nella produzione di glicosidasi, è vantaggioso per le aziende sia dal punto di vista economico, per la riduzione del costo di smaltimento dei residui di lavorazione, sia dal punto di vista ambientale, per la riduzione del carico inquinante nell'ambiente stesso.

In base ai risultati ottenuti si può avanzare l'ipotesi che dal processo di fermentazione utilizzando il pastazzo come induttore della produzione di enzimi si sia ottenuta un'esperidinasi, ovvero un complesso enzimatico costituito da entrambe le attività enzimatiche, α -L-ramnosidasica e β -D-glucosidasica.

Dallo studio di tipo qualitativo delle inibizioni da zuccheri ed acido ascorbico si evince che entrambi gli enzimi risultano inibiti, in maniera diversa, da tutti i costituenti. Studi cinetici futuri sono necessari per definire i meccanismi di inibizione.

L'immobilizzazione dei due enzimi ha dato ottimi risultati, in quanto gli enzimi immobilizzati hanno mantenuto ben il 50% della loro attività in seguito alla procedura di immobilizzazione su silice.

Dai risultati preliminari ottenuti da questo studio si possono prospettare diverse linee di sviluppo future:

- ricercare un metodo efficace al fine di separare l' α -L-ramnosidasi dalla β -D-glucosidasi, in quanto l'inattivazione termica e l'inattivazione acida non costituiscono una separazione, ma permettono di utilizzare uno dei due enzimi senza l'interferenza dell'altro..
- verificare la stabilità degli enzimi immobilizzati a diversi valori di pH.

- saggiare l'attività dell' α -L-ramnosidasi sulla molecola target dell'esperidina per ottenere l'esperitina-7-glucoside, che sarà il punto di partenza per ottenere il rispettivo diidrocalcone, un potenziale dolcificante.

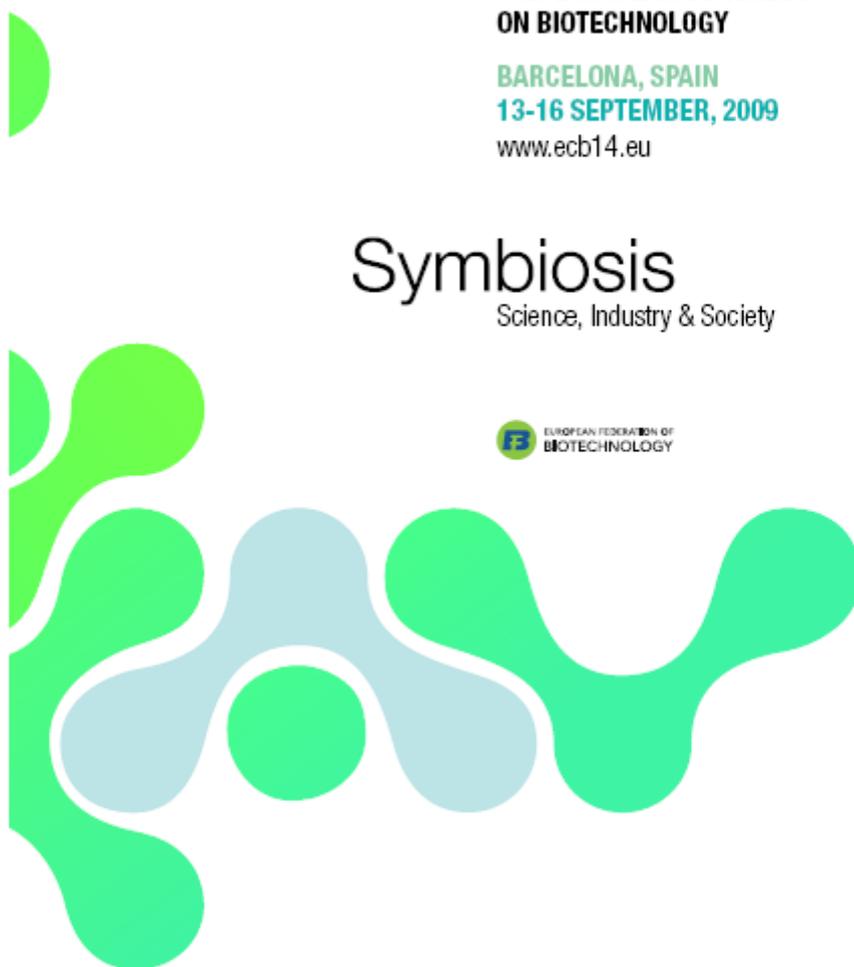
Abstract 1

**14th EUROPEAN CONGRESS
ON BIOTECHNOLOGY**

**BARCELONA, SPAIN
13-16 SEPTEMBER, 2009**
www.ecb14.eu

Symbiosis

Science, Industry & Society



the effect of varying the turbulent kinetic energy dissipation rate on microbial growth is investigated in a Taylor—Couette reactor. In this type of reactor the dissipation rate is more homogeneous than in a standard stirred reactor. The characteristics of the flow in this reactor have been previously studied by experimental work (Particle Image Velocimetry, PIV) and simulations (RANS & RSM k - ϵ). Mixing and particle tracking experiments performed by LES simulations are added in the present work. The experimental part of the work presents the results obtained in a series of batch cultures of *L. lactis* NCDO 2118 under anaerobic conditions, in M17 medium, at 30°C and at regulated optimal pH. Two initial glucose concentrations (5 and 25 g/L) were tested for each rotation speed. In such a batch culture, no macroscopic concentration gradient is expected since the medium is initially homogeneous and the characteristic time of the glucose assimilation is greater than the macromixing time all through the culture. Two mixing intensities (amount of energy dissipated) were obtained by varying the rotation speed (20 and 114 rpm). The results are first compared in terms of growth, metabolism and macroscopic aspect of the bacterial culture.

Under the lower energy dissipation rate, *i.e.* at 20 rpm, the maximal specific growth rate was slightly reduced compared to the faster mixing condition. Moreover a “mucoid” form was observed for glucose rich cultures at 20 rpm. These observations thus indicate that both metabolism and phenotypic aspect of *L. lactis* are modified as a consequence of whether the local mixing conditions or the flow structure, or both.

Further analyses are in progress to characterize the filaments and their origin (mechanical and/or metabolic stress, modifications in the C/N flux ratio as a consequence of limiting transfer at the micro scale).

To our knowledge, such a link between growth conditions under two mixing intensities and the phenotype of the culture has never been reported. This experimental design and the results obtained contribute to a better understanding of the cell—environment interactions at the cell scale.

doi:10.1016/j.nbt.2009.06.149

2.6.044

Recombinant peroxidase production in species of *Lepidoptera* frequently found in Argentina

L.V. Romero^{1,*}, A.M. Targovnik¹, M.N. Fogar², M.A. Simonella², O. Cascone¹, M.V. Miranda¹

¹ University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

² INTA EEA Sáenz Peña, Argentina

Baculovirus-insect cell system is a popular choice for heterologous gene expression when a eukaryotic environment is required. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) is the most studied baculovirus expression vector. Its relatively wide host range of Lepidoptera—Noctuidae larvae compared to other baculoviruses makes it a powerful tool for recombinant protein expression in these “bio-factories”. *In vivo* expression system seems to be economically more advantageous than insect cell cul-

ture due to its lower cost and higher protein yield. In Argentina, many important crops such as soy and corn are frequently affected by insect plagues including *Rachiplusia nu*, *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa zea*. Horseradish peroxidase isozyme C (HRPC) is an important commercial biocatalyst. Its complex structure complicates its recombinant expression in prokaryotes in active form. Two recombinant viruses were constructed to compare the performance of HRPC expression in the aforementioned Lepidopteran hosts. The first (AcMNPVHRPC occ-) was formed by introducing the HRPC gene in *locus* polyhedrin so it resulted in an intrahaemocoelically infective virus. The second (AcMNPVHRPC occ+) was identical except for polyhedrin gene presence under p10 promoter to achieve polyhedra production capability for oral administration. Each species was infected with both viruses and harvesting day post-infection (dpi) was optimized. All species were successfully infected by AcMNPVHRPC occ-: *S. frugiperda* (7dpi), *R. nu* (4 dpi) and *H. zea* (6 dpi) expressed 312, 122 and 38 mg HRPC/kg larva, respectively. On the other hand, only *R. nu* was highly susceptible to oral infection. Injection of both viruses produced practically the same expression kinetic profile; therefore, polyhedrin gene presence under p10 promoter does not affect HRPC expression. According to these results, AcMNPVHRPC occ+ could be used intrahaemocoelically with the great advantage of being also suitable for oral infection of permissive Lepidoptera. Oral administration reduces larvae death risk because of manipulation and is easier to scale-up. However, AcMNPVHRPC occ- infection efficiency was 100% in all experiments and HRPC levels were higher compared with AcMNPVHRP occ+ infection. In conclusion, the design of the most suitable and profitable strategy will depend on the host availability and the protein amount required.

doi:10.1016/j.nbt.2009.06.150

2.6.045

New microbial-enzymatic process for the synthesis of an α -L-rhamnosidase from *A. Terreus*

E. Abbate*, R. Palmeri, C.Motta, A. Ioppolo, G. Spagna

University of Catania, Catania, Italy

From industrial citrus processing the waste products are obtained, they are essentially peel and pulp, called “pastazzo”, its production is approximately 50—60% (w/w). The citrus solid wastes are rich in fermentable material about 7% of sugar, besides they contain high concentrations of flavanone glycosides as hesperidin and naringin and lower amounts of many other flavonoids. An orange contains about 1 g of hesperidin, whereas citrus solid wastes contain about 400 g ton⁻¹ of hesperidin. The waste disposal is very expensive for industries.

Aim of this work was the use of citrus solid wastes for the growth of fungi, the production of an α -L-rhamnosidase (Rha, EC 3.2.1.40) activity and its characterization. Among a total of four *Aspergilli* spp. cultures medium containing citrus solid wastes as carbon source and for the synthesis of a Rha. Rhamnosidase hydrolyse flavonoid glycoside to release L-rhamnose and the correspond-

ing glucoside, in particular hydrolyse the hesperidin-7-glucoside bond to release hesperetin-7-glucoside, it is both a precursor in sweetener production an important bioactive molecule. *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* are strains good producers of glycosidases. They were growth in a medium containing the citrus solid waste as specific inducer. Microbial Rha has been characterized from a culture of *A. terreus*, it was the best producer of enzyme in the extracellular medium. Using *p*-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside as substrate, the enzyme exhibited Michaelis–Menten kinetics with K_m and V_{max} values of 0.52 mM and 19.28 U/mg, respectively. The optimum of pH and temperature for the enzyme were found to be 4 and 50 °C respectively. Glucose, fructose, rhamnose and ascorbic acid decrease progressively the enzyme activity since at low concentrations (% w/v) of inhibitor.

β -D-glucosidase (β G EC. 3.2.1.21) is a collateral activity produced by *A. terreus* and it hydrolyse hesperetin-7-glucoside to release glucose and the relative aglicon, hesperetin. It shows a low biological activity respect to hesperetin-7-glucoside. For that reason were determined reaction conditions for β -D-glucosidase produced in the same medium than α -L-rhamnosidase. The results suggest that both enzymes (Rha and β G) have different physical–chemical characteristics, because of the β -D-glucosidase in specific conditions shows a low activity so that it does not interfere with α -L-rhamnosidase activity.

doi:10.1016/j.nbt.2009.06.151

2.6.046

Monitoring of glucose and ammonium concentration in *Streptomyces coelicolor* fermentations using *in situ* Nir

N. Petersen^{1,*}, P. Ödman¹, A. Cervera¹, S. Stocks², A. Eliasson Lantz¹, K. Germaey¹

¹ Technical University of Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark

² Novozymes, Denmark

Efficient monitoring and control of fermentations requires rapid and accurate measurements of the state of the process. Near infrared (NIR) spectroscopy is one of the most promising technologies and a number of studies have explored the subject. However, several challenges remain for the use of *in situ* NIR spectroscopy in fermentations. Particularly challenging are the highly aerated and agitated processes with filamentous organisms. In this study *in situ* NIR spectroscopy was used for monitoring of glucose and ammonium in *Streptomyces coelicolor* fermentations.

The calibration of prediction models based on fermentation data is made difficult by the inherent correlation between the analytes, e.g. glucose is correlated to biomass concentration. To eliminate this problem the standard fermentation data was supplemented with spectra collected on a set of semi-synthetic samples, a method previously used for calibration of off-line models. The semi-synthetic samples were generated by adding concentrated solutions of biomass, glucose and ammonium to centrifuged fermentation broth *in situ*. Five different batches were used for the generation of semi-synthetic samples.

Partial least squares regression (PLS) models were calibrated for the prediction of glucose and ammonium. For glucose external validation on an independent fermentation batch resulted in a prediction error of 1.1 g/L (range 0–32 g/L) which is highly satisfactory. The fact that both the standard batches as well as the semi-synthetic samples were predicted well by the model provides certainty that models are based on a specific signal from glucose and not correlation to other analytes. For ammonium the validation resulted in a high prediction error of 11 mM (range 39–111 mM). For comparison the samples corresponding to the *in situ* data were measured on an off-line NIR spectrometer as well. The off-line data resulted in highly satisfactory prediction models with a prediction error of 4.0 mM. The large difference may be explained by the fact that the spectra collected *in situ* are subjected to noise in the wavelength region above 2000 nm due to the use of optical fibers.

In conclusion, by using a combination of standard and semi-synthetic samples it was shown that the glucose concentration can be measured accurately in a complex fermentation process using analyte-specific spectral information obtained via *in situ* NIR spectroscopy. For ammonium a large increase in prediction error was observed for *in situ* measurements compared to off-line, which indicates that the good results obtained in previous studies off-line are not easily transferred to the *in situ* setting.

doi:10.1016/j.nbt.2009.06.152

2.6.047

Fluorescent microorganisms: a relevant tool to quantify the relationships between environmental conditions and 3D microbial organization in biological aggregates

S. Beaufort^{*}, S. Alfenore, C. Lafforgue

INSA de Toulouse, Toulouse Cedex4, France

The aim of this project deals with the analysis of the relationships between the organization and the activity of microbial populations in complex structures such as deposits, flocs or biofilms that can be encountered in numerous devices as in membrane bioreactors systems. Both the structure and the activity in biological aggregates depend on environmental conditions (hydrodynamic, biological and chemical environment ...).

fluorescent *in situ* hybridization (FISH) method is currently used to study the organization of complex biological aggregates. However, this technique requires fixation and /or pre-treatment steps which can modify aggregates structure and avoid a real on-line monitoring. Moreover probes deep penetration cannot be really estimated and could limit the method accuracy. To overcome these limitations, fluorescent microorganisms were constructed to characterize *in vivo* the organization of complex structures. These fluorescent strains (yeasts and bacteria) allow both the identification of each microbial population and the direct visualization of their 3D-organization in the aggregate without any dying treatment which could modify the microbial physiology and /or damage the aggregate structure.

Abstract 2

**14th International
Biotechnology
Symposium
and Exhibition**

IBS 2010



Biotechnology for
the Sustainability of
Human Society

14-18 September 2010
Palacongressi,
Rimini - Italy

Conference Chair:
Professor Fabio Fava
*Aima Mater Studiorum -
University of Bologna, Italy*

Conference Co-Chair:
Professor Francesco Nicotra
*University of Milano-Bicocca
& IUPAC, Italy*

FINAL PROGRAMME

www.ibs2010.org

CONVENOR ORGANIZER CO-ORGANIZER


MINISTERO DELL'UNIVERSITÀ E DELLA RICERCA


Adria Congress
www.adriacongress.com


RIMINI CONVENTION BUREAU

Production and characterization of glycosidases from *Aspergillus terreus* using “pastazzo” as inductor

E. Abbate¹, R. Palmeri^{1,3,*}, A. Todaro¹, A. Ioppolo², G. Spagna¹

¹ University of Catania, DOFATA Food Technology Section, Italy

² University of Catania DACPA, Italy

³ Science & Technology Park of Sicily, Italy

E-mail address: rosapalmeri@hotmail.com (R. Palmeri).

The production of glycosidases from *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) using citrus solid waste as specific inducer was conducted. In industrial citrus processing solid waste products are obtained, they are essentially peel and pulp, called “pastazzo”. The citrus solid wastes are rich in fermentable materials as sugars and pectins, besides they contain high concentrations of flavanone glycosides such as hesperidin and naringin, and lower amounts of many other flavonoids, which are important antioxidant compounds in human health.

An α -L-rhamnosidase (Rha, EC. 3.2.1.40) and β -D-glucosidase (β G, EC. 3.2.1.21) were produced and characterized. They are extracellular enzymes obtained from fermentation of an *A. terreus* strain grown in a medium containing citrus solid waste. They are characterized for the mainly chemical-physical and kinetic parameters, sulphate ammonium precipitation and a new nutshell purification process were used to eliminate collateral proteins.

Enzymes exhibited Michaelis-Menten kinetics with K_m and V_{max} values of 0.52 mM and 8.44 U/mg respectively for Rha and 1.89 mM and 9.41 U/mg for β G. The optimum of pH and temperature were found to be 4 and 50 °C for both enzymes. Glucose, rhamnose and ascorbic acid inhibit both enzyme activities, since at low concentrations (% w/v) of inhibitor.

The results suggest that both enzymes (Rha and β G) have different kinetic characteristics, because of the β -D-glucosidase in specific conditions shows a low activity so that it doesn't interfere with α -L-rhamnosidase activity. This is an important biochemical characteristic, because the Rha hydrolyses flavonoid glycoside to release L-rhamnose and the corresponding glucoside, the enzyme action is carry out on hesperidin-1,6-glicoside bond to release hesperetin-7-glucoside, a precursor in sweetener production and an important bioactive molecule.

β G is also able to hydrolyse hesperetin-7-glucoside, but from the hydrolysis is released glucose and the relative aglicon, hesperetin, that shows a low biological activity respect to hesperetin-7-glucoside.

doi:10.1016/j.jbiotec.2010.10.050

Photocatalytic treatment with fixed-bed TiO₂ catalyst of a PCB-contaminated effluent deriving from soya lecithin-assisted soil washing

G. Zanolli¹, A. Negroni¹, G. Camera Roda², F. Fava¹

¹ DICAM, Faculty of Engineering, University of Bologna, via Terracini 28, 40131 Bologna, Italy

² DICMA, Faculty of Engineering, University of Bologna, via Terracini 28, 40131 Bologna, Italy

An innovative approach to the sustainable remediation of actual site PCB-contaminated soils, consisting of soya lecithin (SL)-assisted soil washing followed by photocatalytic treatment of the deriving contaminated effluents with TiO₂ catalyst freely suspended in the aqueous phase, has recently been developed (Occulti et al., 2008).

In this work, the photocatalytic treatment of the aqueous stream from a SL-assisted washing of a PCB-contaminated soil has been

implemented by using TiO₂ catalyst immobilized on glass beads. The effluent, which was contaminated by PCBs ascribed to Aroclors 1260 and 1242 (51.7 ± 0.5 mg/L) was treated for 45 days in an annular photocatalytic reactor filled with TiO₂-coated glass beads operating in batch mode.

PCBs occurring in the effluent were degraded by 73% and 92% after 14 and 17 days of irradiation, respectively, and then by 97% after 29 days of treatment. No further degradation of PCBs was then observed up to the 45th day. Comparable degradation rates (from 0.048 to 0.059 days⁻¹), referred to the initial concentration, and extents (90.1%-100%) were observed for all congeners. No HPLC/DAD-detectable intermediates were detected in the reaction medium. In addition, the degradation of 99% of total organic carbon was attained at the end of treatment, when 10.1 ± 0.3 mg/L of Cl⁻ were found to accumulate. The effluent irradiation did not significantly affect the concentration of the total heterotrophic and biphenyl-degrading cultivable bacterial biomass occurring in the medium during the first 15 and 21 days, respectively; then, biomass concentration decreased from 10⁷ to 10⁴ CFU/ml.

These results indicate that immobilized TiO₂ catalyst displays a high PCB degradation efficiency and low toxicity to bacterial biomass, similar to those reported for TiO₂ catalyst freely suspended in the aqueous phase. The immobilization does not affect significantly the degradative potential of TiO₂; in addition, it offers the advantages of avoiding the separation of the catalyst from the treated effluent and the possibility of operating in continuous mode.

Reference

Occulti, et al., 2008. Biotechnology and Bioengineering 99 (6), 1525.

doi:10.1016/j.jbiotec.2010.10.051

Impact Assessment of Nanotechnology: a Rapid Appraisal Approach for Environmental and Human Sustainability

K.R.E. Jesus-Hitzschky^{1,*}, O.B.G. Assis^{2,1}

¹ Researcher at Embrapa Environment, Jaguariúna, SP, Brazil. Rodovia SP 340 km 127,5 CP 69 CEP 13820

² Researcher at Embrapa Agricultural Instrumentation Center, São Carlos, SP, Brazil. Rua XV de Novembro, 1452 – CP. 741 CEP: 13560-970
Keywords: Nanotechnology; Impact Assessment; Rapid Appraisal Approach; Environmental and Human Sustainability

E-mail addresses: katiareg@cnpma.embrapa.br (K.R.E. Jesus-Hitzschky), odilio@cnpdia.embrapa.br (O.B.G. Assis).

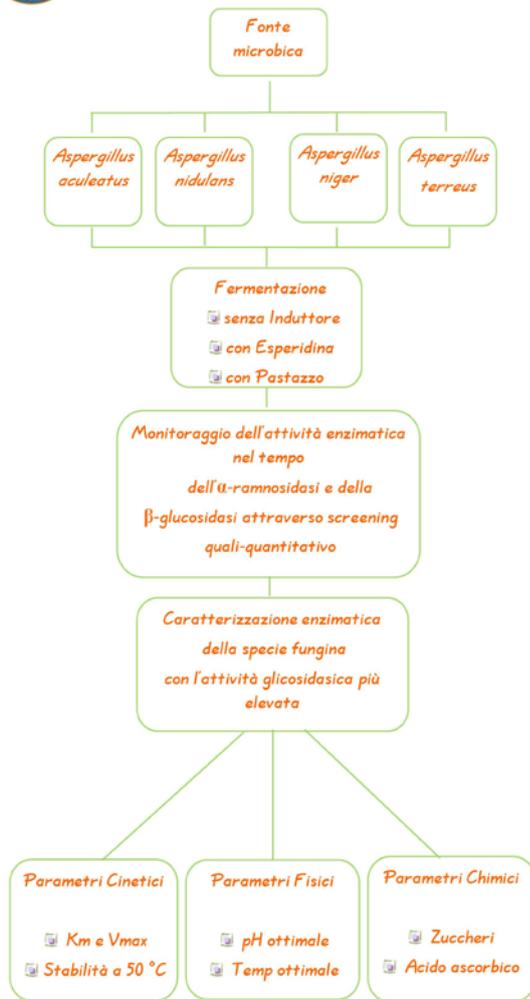
Nanotechnology provides the perspective of great advances in production and process, mainly in agriculture and health areas, what undoubtedly will promote an improvement of life quality and reduce impacts on the environment. In spite of a progressive increasing in the use of nanotechnologies worldwide, their potential is still repressed in Brazil, due to the early stage of the local development and the lack of specific methodologies that make impact assessment into a current practice. Therefore, the development of a methodology for the assessment of nanotechnology impacts is an effective mitigatory measure to face the growing challenges pointed out by scientists and legislators related to environmental degradation, ethical and social issues. The present study aims at creating and validating an impact assessment methodology based on technical data available about technology usage found in the literature, which could be employed as a guide to ex-ante or ex-post evaluations of nanotechnology uses and its implication in the environment exposure. The identification of potential

Poster 1



Abbate E. Palmeri R. Spagna G*

*gspagna@unict.it



I microrganismi che producono glicosidasi sono molto diffusi in natura e giocano un ruolo importante nell'idrolisi e nella catalisi dei polisaccaridi. In diversi lavori sperimentali, i funghi filamentosi, così come specie di aspergilli e tricotermi, sono stati ampiamente studiati.

I funghi filamentosi del genere *Aspergillus* assumono un ruolo di rilevante importanza per l'industria alimentare grazie alla loro abilità di produrre metaboliti, acidi organici e glicosidi extracellulari [1, 2]. Recentemente è stata scoperta la produzione di glicosidasi da *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) e *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*) noto essere di particolare importanza per la produzione di succhi di frutta e nel settore enologico.

La produzione di enzimi da impiegare nell'industria alimentare grazie alla coltivazione su substrati naturali come la bagassa della canna da zucchero (SCB) e la semola di frumento (Wheat bran) e coltivazioni su supporti inerti come la schiuma in poliuretano (PUF) ed utilizzando naringina o il rammosio come induttore [3, 4]. In recenti lavori è riportato che l'esperidina è un induttore per la sintesi di glicosidasi, in particolare di β-D-glucosidasi (BG), α-L-ramnosidasi (Rha) [5].

Il sottoprodotto di scarto dell'industria agrumaria, noto come "pastazzo" è ricco in pectina, cellulosa, emicellulosa, flavonoidi ed esperidina e può essere usato come substrato per la crescita dei microrganismi.

L'impiego di pastazzo per la produzione di enzimi, ed in particolare di glicosidasi, sarebbe vantaggioso sia per la riduzione dei costi di smaltimento dei residui di lavorazione, sia per la riduzione del carico inquinante per l'ambiente dei sottoprodotti di scarto.

Da test effettuati in laboratorio su quattro specie di *Aspergilli* (*aculeatus*, *niger*, *nidulans* e *terreus*) è stato riscontrato che un particolare ceppo di *Aspergillus terreus* è in grado di produrre BG e Rha utilizzando come induttore il pastazzo. Tale risultato è messo in confronto con la produzione delle stesse attività in presenza di esperidina.

L'ottimizzazione del processo di produzione potrebbe essere oggetto di studi futuri, dato che dalla caratterizzazione sia dell'α-L-ramnosidasi che della β-D-glucosidasi sono emersi dei risultati interessanti per una futura applicazione nel campo dei succhi di frutta.

[1] Barbesgaard P., 1977 British Mycological Society Symposium Series 391-404

[2] Bennett J.W., 1985 Journal of Biotechnology 66 101-107

[3] Orejas, M., Ibanñez E. and Ramañan, D. 1999 Letters in Applied Microbiology 28, 383-388

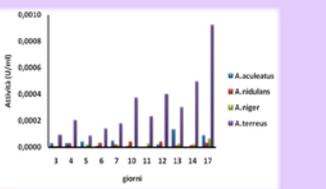
[4] Elinbaum S., Ferreyra H., Ellenrieder G., Cuevas C. 2002. Lett Appl Microbiol. 34(1): 67-71.

[5] Monti D., Pišvejcová A., Kren V., Lama M., Riva S. 2004. Biotechnol Bioeng. 87: 763-771

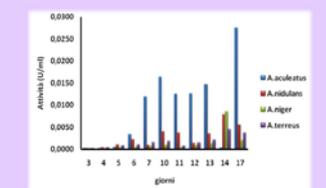


Fermentazione senza Induttore

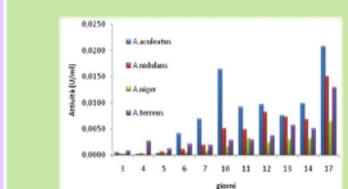
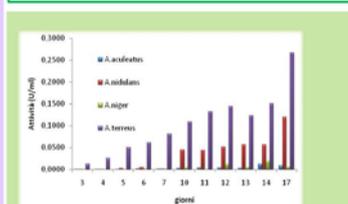
α-ramnosidasi



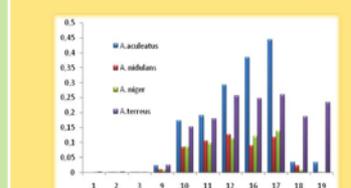
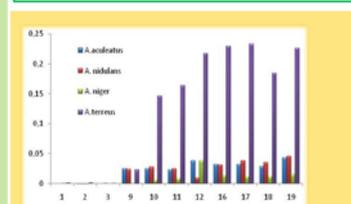
β-D-glucosidasi



Fermentazione con Esperidina



Fermentazione con "Pastazzo"



Poster 2

New microbial-enzymatic process for the synthesis of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus*

Eleonora Abbate*, Rosa Palmeri, Costanza Motta, Antonino Ioppolo and Giovanni Spagna

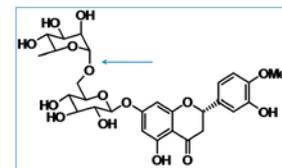
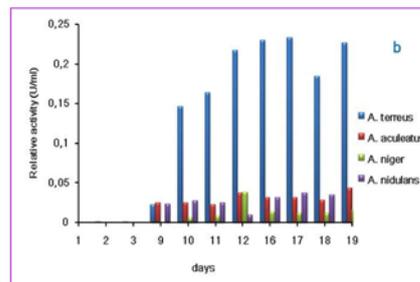
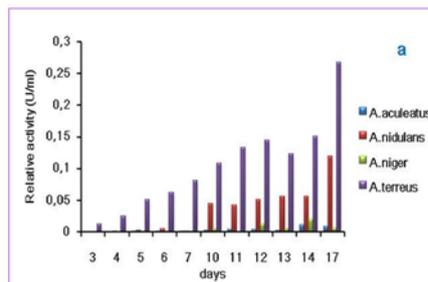
DOFATA-Sezione Tecnologie Agroalimentari, University of Catania, Italy.

* eleonora_abbate@yahoo.it

From industrial citrus processing the waste products are obtained, they are essentially peel and pulp, called "pastazzo". The citrus solid wastes are rich in fermentable material about 7% of sugar, besides they contain high concentrations of flavanone glycosides as hesperidin and naringin. Recent works relate hesperidin as an inducer for the microorganisms for synthesis of glycosidases, in particular β -D-glucosidase (β G, EC 3.2.1.21) and α -L-rhamnosidase (Rha, EC 3.2.1.40). Microorganisms that produce glycosidases are widespread in nature and play an important role in catalysis and hydrolysis of polysaccharides. Aim of this work was the use of citrus solid wastes for the growth of fungi, the production of an α -L-rhamnosidase activity and its characterization.



Among a total of four *Aspergilli* spp. cultures medium containing citrus solid wastes as carbon source and for the synthesis of a Rha.



Rhamnosidase hydrolyse flavanoid glycoside to release L-rhamnose and the corresponding glucoside, in particular hydrolyse the hesperidin 1,6 glycoside bond to release hesperetin-7-glucoside, it is both a precursor in sweetener production and an important bioactive molecule.

FIGURE 1 a, b

Aspergillus aculeatus, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* growth in a cultivation medium contained: KCl; KH_2PO_4 ; NH_4Cl ; MgSO_4 ; yeast extract; Vishniac solution; hesperidin (a) or pastazzo (b). They are strains good producers of glycosidases. They were growth in a medium containing the citrus solid waste as specific inducer or hesperidin.

β -D-glucosidase (β G EC. 3.2.1.21) is a collateral activity produced by *A. terreus* and it hydrolyse hesperetin-7-glucoside to release glucose and the relative aglicon, hesperetin. It shows a low biological activity respect to hesperetin-7-glucoside. The results suggest that both enzymes (Rha and β G) have different physical-chemical characteristics, because of the β -D-glucosidase in specific conditions shows a low activity so that it doesn't interfere with α -L-rhamnosidase activity.

Microbial Rha has been characterized from a culture of *A. terreus*, it was the best producer of enzyme in the extracellular medium, present comparable activity as fermentation with hesperidin as fermentation with "pastazzo".

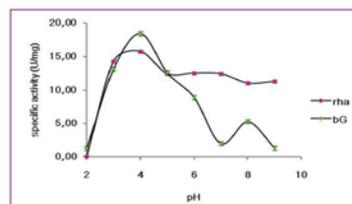


Figure 2

Effect of pH on the activity of β G and Rha. The enzyme activity was determined by standard assay method, by changing the buffer to obtain the desired pH.

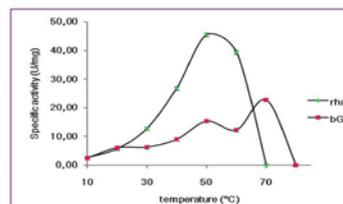


Figure 3

Effect of temperature on the activity of β G and Rha. The enzyme activity was assayed at various temperatures by the standard assay method.

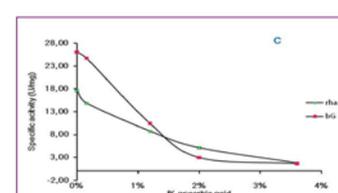
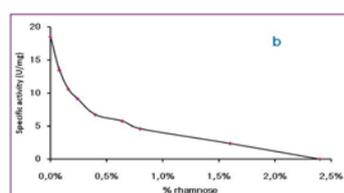
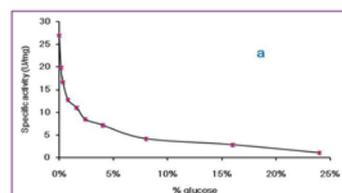


Figure 4 a, b, c

Effects of glucose concentration on the activity of β G (a), of rhamnose concentration on activity of Rha (b) and of ascorbic acid concentration (c) on the activity of β G and Rha

Use of "pastazzo" is profitable for enterprise to reduce cost of waste processing, as for reduction polluting load in the environment. We plan to optimize fermentation process to obtain a higher specific activity for the selected strain. Characterization both the α -L-rhamnosidase β -D-glucosidase gave interesting results for a possible application in the industry of fruit juice.

Poster 3

Production and characterization of glycosidases from *Aspergillus* using “pastazzo” as inducer

Eleonora Abbate*, Rosa Palmeri, Aldo Todaro, Antonino Ioppolo and Giovanni Spagna

DOFATA-Sezione Tecnologie Agroalimentari, University of Catania, Italy.

* eleonora_abbate@yahoo.it

Naringinase is an enzyme complex consisting of a α -L-rhamnopyranosidase (Rha, EC. 3.2.1.40) and β -D-glucopyranosidase (β G, EC. 3.2.1.21) and other glycosidases. The Rha is an enzyme of considerable importance in food technology for increasing the aroma of fruit juices and alcoholic beverages. It is particularly used for debittering of citrus-juice by the hydrolysis of naringin and hesperidin (fig. 2). The aim of this work is the production of Rha from *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) using citrus solid waste (CSW) as specific inducer (fig. 1). In industrial citrus processing CSW are essentially peel and pulp and they are called "pastazzo". CSW are rich in fermentable materials as sugars and pectins, besides they contain high concentrations of a flavanone glycoside as hesperidin and naringin, and lower amounts of many other flavonoids, which are important antioxidant compounds in human health.



Figure 1
A. terreus culture growth in a cultivation medium with "pastazzo".

Microbial glycosidases, Rha and β G, have been characterized from a culture of *A.terreus*, it was the best producer of enzyme in the extracellular medium, present comparable activity as fermentation with hesperidin as fermentation with "pastazzo". The enzyme was also characterized for the mainly chemical-physical and kinetic parameters.

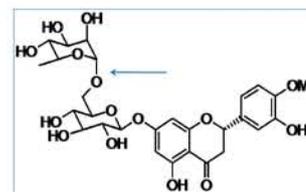


Figure 2
 Hydrolysis of flavanoid glycoside to release and the corresponding glucoside. By the hydrolysis of the hesperidin 1,6 glycoside bond it is released the hesperetin-7-glucoside, which is both a precursor in sweetener production and an important bioactive molecule. The β G hydrolyses glucose producing aglicon hesperitin.

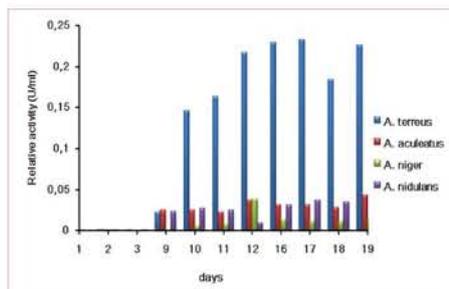


Figure 3
 Among a total of four *Aspergilli* spp. cultures medium containing citrus solid wastes as carbon source for the producing glycosidases: *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* growth in a cultivation medium contained: KCl; KH_2PO_4 ; NH_4Cl ; MgSO_4 ; yeast extract; Vishniac solution; pastazzo.

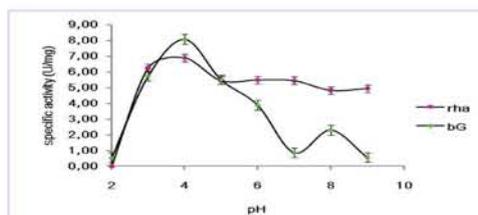


Figure 4
 Effect of pH on the activity of β G and Rha. The enzyme activity was determined by standard assay method, by changing the buffer to obtain desired pH.

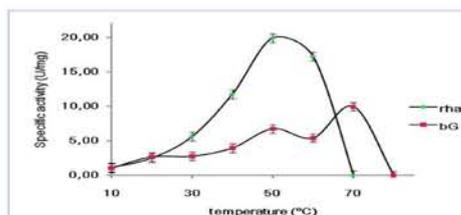


Figure 5
 Effect of temperature on the activity of β G and Rha. The enzyme activity was assayed at various temperatures by the standard assay method.

	K_m	V_{max}
Rha	0,52	8,45
β G	1,89	9,41

Table 1
 The determination of saturation substrate concentration enabled calculation of K_m and V_{max} of two enzymes.

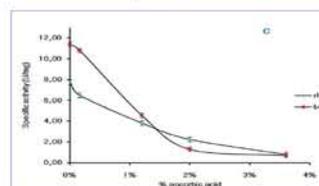
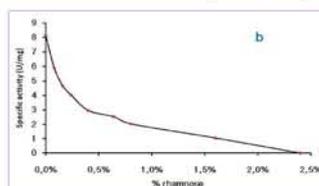
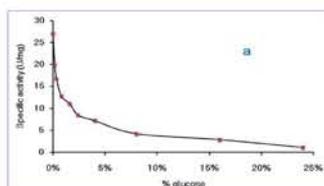


Figure 6a, b, c
 Effects of glucose concentration on the activity of β G (a), of rhamnose concentration on activity of Rha (b) and of ascorbic acid concentration (c) on the activity of β G and Rha

The results suggest that both enzymes (Rha and β G) have different physical-chemical characteristics. In consequence of other test laboratory was confirmed that it is a dimer. β G can be heat inactivating, in specific conditions, at pH=11; 50°C for two hours, so that it doesn't interfere with α -L-rhamnosidase activity (data not shown). This is an interesting result for a possible application of the enzyme in the fruit juices and beverage industry.

Bozza articolo

Production, characterization and immobilization of glycosidases from *Aspergillus terreus* using “pastazzo” as inductor

E.Abbate, R.Palmeri, A. Todaro, G.Spagna and R.M.Blanco

INTRODUCTION

An α -L-rhamnosidase (Rha, EC. 3.2.1.40) and a β -D-glucosidase (β G, EC. 3.2.1.21) produced and characterized. α -L-rhamnosidase hydrolyses the linkage of rhamnose with other compounds, while β -D-glucosidase hydrolyses the linkage of glucose, on several natural product as hesperidin, naringin, rutin. This enzyme complex has considerable importance in food technology for increasing the aroma of wines, musts, fruit juices and other alcoholic beverages. In particular used in citrus-juice processing to improve for debittering by the way of naringin and hesperidin hydrolysis. Naringin is the major component in grapefruit and it is by far the most bitter. The presence of bitterness has been a major limitation in the commercial acceptance of juice. The naringin level can be reduced by several technologies, but these methods may alter the chemical composition of the juice, may affect organoleptic properties and finally quality of juice, may remove nutrients, flavour, color.

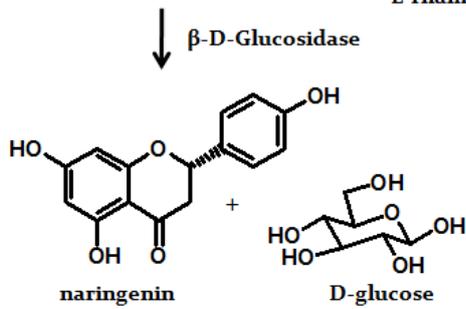
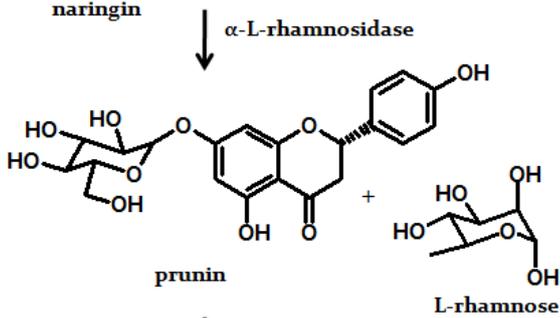
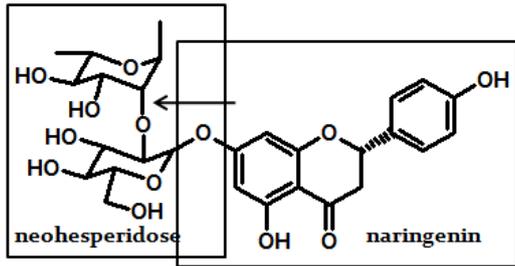
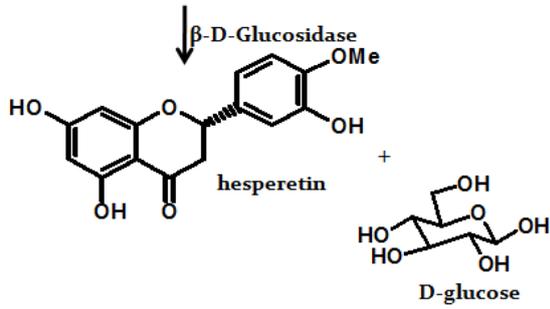
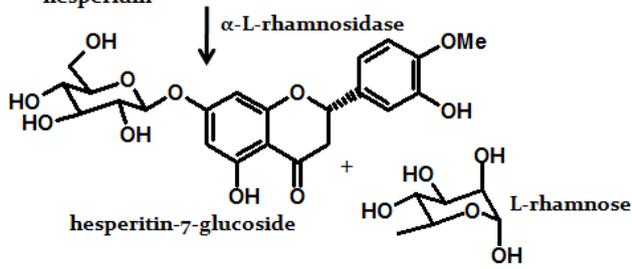
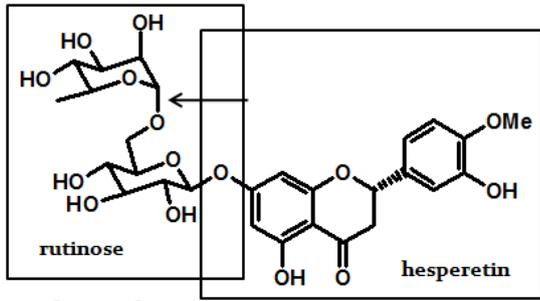
Therefore, acid hydrolysis is not suited to commercial processing. Similarly, under selected conditions of pH and temperature, may completely remove naringin from a solution; however, many of the desirable flavoring components are simultaneously removed.

The deglycosylation of the novel glycopeptide antibiotic, chloropolysporin from *Faenia interjecta*, was achieved successfully by the rhamnosidase activity of naringinase (Sankyo 1988). The enzyme is used to produce L-rhamnose which is a chiral intermediate in organic synthesis and it is used as a pharmaceutical and plant protective agent (Daniels et al. 1990). The production and characterization of an *Aspergillus terreus* α -L-Rhamnosidase activity of naringinase in combination with β -D-glucosidase is considered suitable for aroma enhancement in wine making (Caldini et al. 1994). Among the naringinase-producing fungi, the enzyme preparation from *Penicillium decumbens* (Young et al. 1989) is commercially available. Naringinase obtained from *P. decumbens* had been used for immobilization studies and for the transformation of flavonoids (Manjon et al. 1985; Romero et al. 1985; Puri et al. 2001). Debittering enzymatic processing is a suite

method. The use of enzymes for debittering is increasing rapidly, because also minimize pollution during processing.

The aim this work is a production of α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) using citrus solid waste as specific inducer was conducted. In industrial citrus processing solid waste products are obtained, they are essentially peel and pulp, called "pastazzo". The citrus solid wastes are rich in fermentable materials as sugars and pectins, besides they contain high concentrations of flavanone glycosides, as hesperidin and naringin, and lower amounts of many other flavonoids, which are important antioxidant compounds in human health.

BOZZA



JZLA

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Yeast extract was from OXOID. *p*-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside (pNPR), *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG), L-rhamnose, D-glucose, D-fructose, citric acid were obtained from Sigma. Bradford's reagent for proteins determination was Bio-Rad Laboratories. All other chemicals used were of reagent grade.

Microrganism and cultivation. The strains used in this study originated from the Culture Collection Fungi (CCF), of the Department of Botany, Charles University Prague, Czech Republic. A total of 4 fungal strains belonging to different genera were used. They are *Aspergillus terreus*, *Emericella nidulans*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger*. The strains were cultivated in aerobic conditions at 30°C for 17 days in breakwater flask over a rotary shaker at 120 rpm. The growth medium contained [g/L]: KCl, 0,5; KH₂PO₄, 15; NH₄Cl, 4; yeast extract, 5; 1 ml of Vishniac solution (Vishniac and Santer, 1957); 5 ml 10% w/v of MgSO₄•7H₂O; pastazzo, 15; pH adjusted to 6.0. After sterilization medium inoculated with 5 ml of a spore suspension.

Enzyme assays. α -L-Rhamnosidase and β -D-Glucosidase activity were measured by spectrophotometric method with *p*-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside and *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside as substrates, respectively. The assay mixture contained 200 μ l of substrate solution (prepared in 0,15 M sodium phosphate buffer, pH 5.0) and 800 μ l of enzyme solution, appropriately diluted. After incubation at 35°C for 20 min, the reaction was stopped by addition of 1 ml Na₂CO₃ 1 M. The absorbance at 400 nm due to release of *p*-nitrophenol in the mixture was measured. One unit of α -L-rhamnosidase and β -D-glucosidase activity was defined as the amount of enzyme required to release 1 μ mol of *p*-nitrophenol for min in the reaction.

Protein assay. The protein concentrations were estimated with the Bio-Rad protein assay reagent for the Bradford dye-binding method, with bovine serum albumin (BSA, Sigma) as protein standard.

Purification of α -L-rhamnosidase. To eliminate of β -D-glucosidase activity was solubilised an amount of lyophilized enzyme in NaHCO₃/NaOH 0,065 M buffer and incubated at pH 11.0 for 2 hours at 50 °C.

Immobilization on MS3030. Silica MS3030 used for enzymatic immobilization. A sample of 30 mg of enzymatic lyophilized solubilised in 10 ml of buffer C-P pH 3.5 and 100 mg of silica MS3030 added. The immobilization procedure during 3 hours at room temperature and under slow agitation.

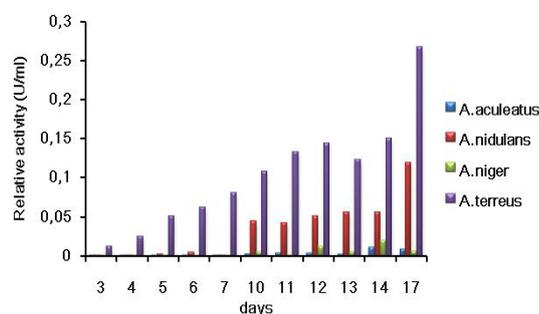
RESULTS AND DISCUSSION

Screening of fungal strain. Among the 4 fungal strains tested for the production of α -L-rhamnosidase and β -D-glucosidase activities using both hesperidin and pastazzo as inductors. All strains showed extracellular activities of both enzymes in presence of only one inductor, and no activity without inductor, except for *A.terreus* (**Fig. 1**) that showed a low activity also without inductor. *A.terreus* is the strain that shown the higher α -L-rhamnosidase activity, that has more activity than other strains. It presents comparable activity as fermentation with hesperidin as fermentation with pastazzo.

Effect of pH and temperature on enzyme activity.

The optimum pH was at 4.0 for both the enzymes (**Fig. 2**). The effect of pH was tested in a range between 3 and 9. The α -L-rhamnosidase and β -D-glucosidase have different behaviour, and they are stable in this range. α -L-rhamnosidase have almost 80% activity between 5 and 9, while β -D-glucosidase already at pH 6 lost 50% activity. The optimum temperature for both crude enzymes was found to be 50°C (**Fig. 3**). The α -L-rhamnosidase lost 15% activity at 60°C and both enzymes lost 40% activity at 40°C. At 70°C was completely abolished. The study of stability crude enzymes in optimal conditions showed that β -D-glucosidase lost 50% activity after 7 hours of incubation at pH 4 and at 50°C, while α -L-rhamnosidase 30% activity after 70 hours.

Figure 1. Fermentation of four *Aspergillus* in medium containing pastazzo as inductor



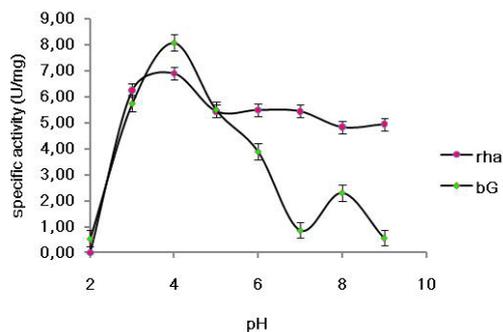


Figure 2. Effect of pH on the activity of βG and Rha

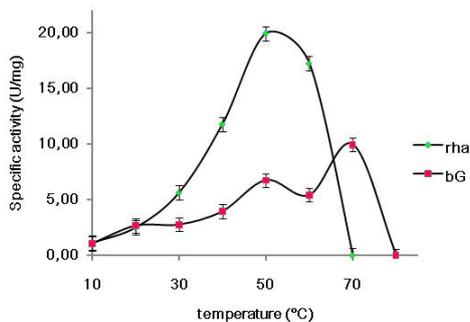


Figure 3. Effect of temperature on the activity of βG and Rha.

Kinetics parameters. Kinetics parameters, maximum reaction velocity (V_{max}) and apparent Michaelis-Menten constant (K_m), were determined for crude enzymes with respect to the artificial substrate: *p*-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside for α -L-rhamnosidase and *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside for β -D-glucosidase, Lineweaver-Burk plot. For α -L-rhamnosidase K_m measured was 0,52 mM and V_{max} was found to be 8,45 U/mg; while for β -D-glucosidase K_m was 1,89 mM and V_{max} 9,41 U/mg.

Inhibition by sugars and ascorbic acid. Inhibition tests was done with *p*-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside and *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside as substrates. α -L-rhamnosidase had 50% of its maximal activity in presence of 0,24% of L-rhamnose; β -D-glucosidase showed 50% inhibition by D-glucose at a concentration of 0,80%. Both enzymes didn't show inhibition by D-fructose. In presence of ascorbic acid at a concentration of 1,20%, both enzymes lost 50% their activity (**Fig. 3 a, b, c**).

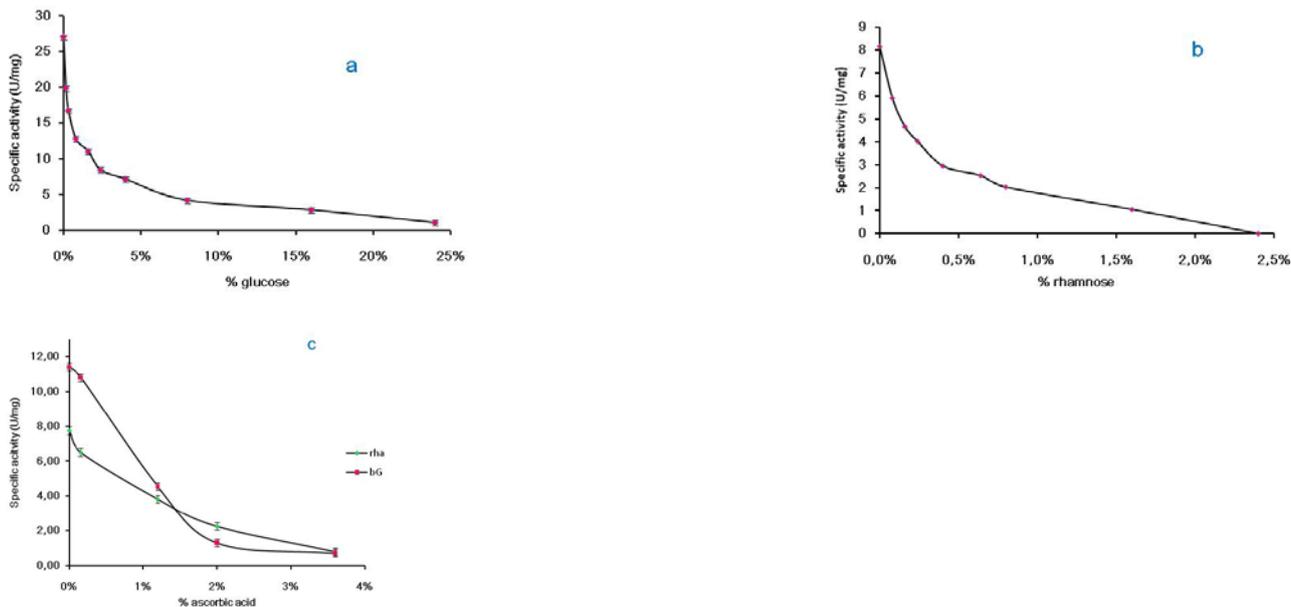


Figure 3. Effects of glucose concentration on the activity of β G (a), of rhamnose concentration on activity of Rha (b) and of ascorbic acid concentration (c) on the activity of β G and Rha.

Purification of α -L-rhamnosidase. A frequent difficulty in purification of α -L-rhamnosidase is the removal of β -D-glucosidase. A lot of work reported separation of two enzymes with ion exchange, size exclusion or DEAE-sepharose chromatography. Due to the great stability of the α -L-rhamnosidase at high pH, the contaminant activity was easily reduced incubating at pH 11 at 50 °C for 2 hours. In this conditions β -D-glucosidase activity was eliminated and α -L-rhamnosidase was preserved 80% its activity.

Immobilization on silica MS3030. Enzymes was immobilized in silica MS3030 by means adsorption. Immobilized enzymes preserve 50% their original activity and their activity decrease in the five following days.

Conclusions. From results the best strain producing α -L-rhamnosidase is *A.terreus*. We obtained interesting results from characterization of enzymes for a possible use in industrial citrus process. The use of citrus waste is a advantage for the company because decrease the expenses for waste disposal.

Bibliografia

Afaq Z., Yadav K.K., Yadav K.D.S. (1997). Baggase based matrix immobilization of enzymes. *Indian J. Chem.* v. 36, p.190–192.

Andersson S., Russell D.W., (1990). Structural and biochemical properties of clones and expressed human and rat steroid 5 alpha reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,v. 87, p. 3640 – 3644.

Bader G., Wray V., Just U., Hiller K. (1998). Enzymatic hydrolysis of the cytotoxic triterpenoid glycoside virgaureasaponin 1. *Phytochemistry* v. 49, p.153–156.

Bampidis V.A., Robinson P.H. (2006). Citrus by-products as ruminant feeds: A review *Animal Feed Science and Technology.* v. 128, p. 175–217.

Barbagallo R.N., Palmeri R., Fabiano S., Rapisarda P., Spagna G. (2007) Characteristic of β -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzyme and Microbial Technology.* v. 41, p. 570–575

Barrio R.G.L., Trindade L.M., Manzanares P., Graaff L.H.D., Barberan F.T.S., Espin J.C. (2004). Production of bioavailable flavonoid glucosides in fruit juices and green tea by use of fungal α -L-rhamnosidases. *J Agric Food Chem.* v. 52, p.6136–6142.

Belancic A., Gunata Z., Vallier M.J., Agosin E. (2003). β -glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces Vanrijae* : purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 51, p. 1453-1459.

Bhatia Y., Mishara S., Bisaria V. S. (2002). Microbial β -glucosidases: cloning, properties and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. v. 22, p. 375-407.

Birgisson H., Wheat J.O., Hreggvidsson G.O., Kristjansson J.K., Mattiasson B. (2007). Immobilization of a recombinant *Escherichia coli* producing a thermostable α -L-rhamnosidase: creation of a bioreactor for hydrolyses of naringin. *Enzyme Microb Technol.* v. 40, p. 1181–1187.

Bloom H., Thomassen M.S., (1983). Kinetic studies on strawberry anthocyanin hydrolysis by a thermostable anthocyanin b-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Food.Chem.* v. 12, p. 197-204.

Bourbouze R., Pratviel-Sosa F., Percheron F. (1975). Rhamnodiastase et α -L-rhamnosidase de *Fagopyrum esculentum*. *Phytochemistry*. v. 14, p. 1279–1282.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, p. 248-254.

Busto M.D., Meza V., Mateos N.P. (2007). Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly (vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. *Food Chem.* v. 104, p. 1177–1182.

Cabaroglu T., Selli S., Canbas A., Lepoutre J.P., Gunata Z. (2003). Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enzyme Microb Technol.* v. 33, p. 581–587.

Caldini C., Bonomi F., Pifferi P.G., Lanzarini G., Galante Y.M. (1994). Kinetic and immobilization studies on the fungal glycosidases for the aroma enhancement in wine. *Enzyme Microb Technol.* v. 16, p. 286–291.

Chase T. (1974). Flavour enzymes. *Advances in Chemistry Series.* v. 136, p. 241-266.

Cheetham P.S.J, Quail M.A. (1991). Process for preparing l-rhamnose. *US Patent.* 5.077, 206.

Chen M., Qin Y., Liu Z., Liu K., Wang F., Qu Y. (2010). Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme and Microbial Technology.* v. 46, p. 444–449

Day A. J., DuPont M.S., Ridley S., Rhodes M., Rhodes M.J.C., Morgan M.R.A., Williamson G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Letters* . v. 436, p. 71-75.

Elinbaun S., Frreyra H., Ellenrieder G., Cuevas C. (2002). Production of *Aspergillus terreus* α -L-rhamnosidase by solid state fermentation. *Lett Appl Microbiol.* v. 34, p. 67–71.

Elujoba A.A., Hardman R. (1987). Diosgenin production by acid and enzymatic hydrolysis of fenugreek. *Fitoterapia.* v. 58, p. 299–303.

Erlund I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.* p. 851–874.

Feng B., Kang L., Ma B., Quan B., Zhou W., Wang Y. (2007). The substrate specificity of a glucoamylase with steroidal saponin-rhamnosidase activity from *Curvularia lunata*. *Tetrahedron* v. 63, p. 6796–6812.

Feng B., Ma B., Kang L., Xiong C., Wang S. (2005). The microbiological transformation of steroidal saponins by *Curvularia lunata*. *Tetrahedron*. v. 61, p. 11758–11763.

Gallego M.V., Pinaga F., Ramon D. and Valles S. (2000) Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in winemaking. *Journal of Food Science*, v. 66, No.2.

Gerardi C., Blando F., Santino A. Zacheo G. (2001). Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Fruit Plant Science*. v. 160, p. 795-805

Grace M. E., Newman K.M., Scheinker V., Berg-Fussman A., Grabowski G.A. (1994). Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. *Journal of Biological Chemistry*. v. 269, p. 2283-2291.

Gray G.M., Olson A.C. (1981). Hydrolysis of high levels of naringin in grape juice using a hollow fiber naringinase reactor. *J Agric Food Chem* v. 29(6), p. 1299–301.

Gueguen Y., Chemardin P., Pien S., Arnaud A., Galzy P. (1997). Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. *Journal of Biotechnology*, v. 55, p. 151–156.

Hays W. S., Vanderjagt D.J., Bose B., Serianni A.S., Glew R.H. (1998). Catalytic mechanism and specificity for hydrolysis and transglycosylation reactions of cytosolic β -glucosidase from guinea pig liver. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 34941-34948.

Hall D.H. (1938). A new enzyme of the glycosidase type. *Chem Ind.* v. 57, p. 473.

Hashimoto W., Murata K. (1998). α -L-Rhamnosidase of *Sphingomonas* sp. R1 producing an unusual Exopolysaccharide of Sphingan. *Biosci Biotechnol Biochem.* v. 62(6), p. 1068–74.

Hashimoto W., Nankai H., Sato N., Kawai S., Murata K. (1999). Characterization of α -L-rhamnosidase of *Bacillus* sp. GL1 responsible for the complete depolymerization of gellan. *Arch Biochem Biophys.* v.368, p. 56–60.

Hernandez L.F., Espinosa J.C., Fernandez-Gonzalez M., Briones A. (2003). β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology.* v.80, p. 171– 176.

Huang, H.T. (1956). The kinetics of decolorization by fungal anthocyanase *J.Am.Chem.Soc.* v. 78, p. 2390-2393.

Ito T., Takiguchi Y. (1970). Naringinase. *Japanese Patent.* 7,014,875.

Jäger S., Brumbauer A., Feher E., Rezcey K., Kiss L. (2001) Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 17, p. 455-461.

Jager S. and Kiss L. (2005). Investigation of the active site of the extracellular β -D-glucosidase from *Aspergillus carbonarius*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* v. 21, p. 337–343.

Jang I.S., Kim D.H. (1996). Purification and characterization of α -L-rhamnosidase from *Bacteroides JY-6*, a human intestinal bacterium. *Biol Pharm Bull.* v. 19, p. 1546–1549.

Katayeva I. A., Glovchenko N.P., Chuvilskaya N.A., Akimenko V.K. (1992). *Clostridium thermocellum* β -glucosidases A and B: purification, properties, localization, and regulation of biosynthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, p. 407-412.

Kaul T.N., Middleton E., Ogra P.L. (1985). Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.*, v.15, p. 71–79.

Kim D.H., Jung E.A., Sohng I.S., Han J.A., Kim T.H., Han M.J. (1998). Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.* v. 21(1), p. 17-23.

Koseki T., Mese Y., Nishibori N., Masaki K., Fujii T., Handa T. (2008). Characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus kawachii* and its gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 80, p. 1007–1013.

- Krasnobaev V. (1973). Insoluble naringinase preparation to deprive grape fruit juice bitterness. *German. Patent* 2,247,022.
- Kurosawa Y., Ikeda K., Egami F. (1973). α -L-Rhamnosidases of the liver of *Turbo cornutus* and *Aspergillus niger*. *J Biochem.* v. 73, p. 31–37.
- LeTraon-Masson M.P., Pellerin P. (1998). Purification and characterization of two β -D-glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation: affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 22, p. 374–82.
- Madamwar D., Patel S. and Parikh H. (1989). Solid state fermentation for cellulase and β -glucosidase production by *Aspergillus niger*. *Journal of fermentation and bioengineering.* v. 67, p. 424-426.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A. and Rémésy C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies 1–3 *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;v. 81, p. 230S-242S.
- Manthey J.A. and Grohmann K. (1996). Concentrations of hesperidin and other orangepeel flavonoids in citrus processing byproducts *J. Agric. Food Chem.*, 1996, v. 44, p. 811-814.
- Manthey J.A. and Guthrie N. (2002). Antiproliferative Activities of Citrus Flavonoids against Six Human Cancer Cell Lines. *J. Agric. Food Chem.* v.50, p. 5837-5843.
- Manzanares P., Broeck H.C.V., Graaff L.H.D., Visser J. (2001). Purification and characterization of two different α -L-rhamnosidases, RhaA and RhaB from *Aspergillus aculeatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 67, p. 2230–2234.

Manzanares P., Orejas M., Gil J.V., Graaff L.H., Visser J., Ramon D. (2003). Construction of a genetically modified wine yeast strain expressing the *Aspergillus aculeatus* rhaA gene, encoding an α -L-rhamnosidase of enological interest. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 69, p. 7558–7562.

Manzanares P., Orejas M., Ibanez E., Valles S., Ramon D. (2000). Purification and characterization of an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus nidulans*. *Lett. Appl. Microbiol.* v. 31, p. 198–202.

Marana S. R., Terra W. R., Ferreira C. (1995). Midgut β -D-glucosidases from *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae). Physycal properties, substrate specificities and function. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 25, p. 835-843.

Martino A., Pifferi P.G., Spagna G. (1994). Production of β -glucosidase by *Aspergillus niger* using carbon sources derived from agricultural wastes. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v. 60, p. 247-252.

Mateo J.J., Jimenez M. (2000). Monoterpenes in grape juice and wines-review. *J. Chromatogr. A*, v. 881, p. 557–567.

Mateo J.J. and Di Stefano R. (1997). Description of the b-glucosidase activity of wine yeast. *Food Microbiology*. v. 14, p. 583-591.

Monti D., Pisvejcova A., Kren V., Lama M., Riva S. (2004). Generation of an α -L-rhamnosidase library and its application for the selective derhamnosylation of natural products. *Biotechnol. Bioeng.* v.87, p. 763-771.

Nemeth K., Plum G.W., Berrin J.G., Juge N., Jacob R., Naim H.Y., Williamson G., Swallow D.M., Kroon P.A. (2003). Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition*, v. 42, p. 29-42.

Niutta P.P., Mordaci R., De Majo M., Pugliese M., De Domenico A. (2006). Depectinized non-dried lemon pulp (DLP) as animal food for ovines: preliminary results. http://www2.vet.unibo.it/staff/gentile/femesprum/Pdf%20Congressi/XIII%20congresso%20Bari/Niutta_2.pdf.

Oda Y., Saito K., Ohara-Takada A., Mori M. (2002). Hydrolysis of the potato glycoalkaloid α -chaconine by filamentous fungi. *J. Biosci. Bioeng.* v. 94, p. 321– 325.

Orejas M., Ibanez E., Ramon D. (1999). The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* produces an α -L-rhamnosidase of potential oenological interest. *Lett. Appl. Microbiol.* v. 28, p. 383–388.

Orrillo A.G., Ledesma P., Delgado O.D., Spagna G., Breccia J.D. (2007). Cold-active α -L-rhamnosidase from psychrotolerant bacteria isolated from a sub-Antarctic ecosystem. *Enzyme Microb. Technol.* v. 40, p. 236–241.

Paavilainen S., Hellman J., Kopela T. (1993). Purification, characterization, gene cloning, and sequencing of a new β -glucosidase from *Bacillus circulans* 116 *subsp.* *Alkalophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 927-932.

Park S., Kim J., Kim D. (2005). Purification and characterization of quercitrin hydrolyzing α -L-rhamnosidase from *Fusobacterium* K-60, a human intestinal bacterium. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 15, p. 519–524.

Ponton J., Low N. H. (2002). Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, p. 679-690.

Prakash S., Singhal R.S., Kulkarni P.R. (2002). Enzymic debittering of Indian grapefruit (*Citrus paradisi*) juice. *J. Sci. Food Agric.*, v. 82, p. 394–397.

Puri M., Banerjee A., Banerjee U.C. (2005). Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC-1344. *Process. Biochem.* v. 40, p. 195–201.

Puri M., Kalra S. (2005). Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v. 21, p. 753–758.

Puri, M., Marwaha, S.S., Kothari, R.M. and Kennedy, J.F. (1996.) Biochemical basis of bitterness in citrus fruit juices and biotech approaches for debittering. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 16, p. 145-155.

Puri M., Marwaha S.S., Kothari R.M. (1996). Studies on the applicability of alginate entrapped naringinase for the debittering of kinnow juice. *Enzyme Microb. Technol.* v. 18, p. 281–285.

Qian S., Yu H., Zhang C., Lu M., Wang H., Jin F. (2005). Purification and characterization of dioscin- α -L-rhamnosidase from pig liver. *Chem. Pharm. Bull.* v. 53, p. 911–914.

Randall G. C., Manthey J.A., Baker R.A. and Grohmann K. (2001). Purification and Characterization of a Beta-Glucosidase from *Citrus sinensis* var. Valencia Fruit Tissue *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 4457-4462.

Reetz M.T. (1997). Entrapment of biocatalysts in hydrophobic Sol-Gel materials for use in organic chemistry. *Adv. Mater.* 1997, v. 9, p. 943-954.

Ribeiro I.A.C, Ribeiro M.H.L. (2008). Kinetic modelling of naringin hydrolysis using a bitter sweet alfa-rhamnopyranosidase immobilized in k-carrageenan. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 51, p. 10–18.

Riccio P., rossano R., Vinella R., Domizio P., Zito F., Sansaverino F., D'Elia A., Rosi I. (1999). Extraction and immobilization in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 123-129.

Rodriguez M.E., Lopes C.A., Valles S., Caballero A.C. (2010). Characterization of α -rhamnosidase activity from a Patagonian *Pichia guilliermondii* wine strain. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, p. 2206-2013.

Roitner M., Schalkhammer T., Pittner F. (1984). Preparation of prunin with the help of immobilized naringinase pretreated with alkaline buffer. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 9, p. 483–488.

Romero C., Manjon A., Bastida J., Iborra J.L. (1985). A method for assaying rhamnosidase activity of naringinase. *Anal. Biochem.* 1985;v. 149, p. 566–571.

Schwab W., Scheller G., Schreier P. (1990). Glycosidically bound aroma components from sour cherry. *Phytochem.* v. 29, p. 607–612.

Schwab W., Schreier P. (1990). Glycosidic conjugates of aliphatic alcohols from apple fruit (*Malus sylvestris* Mill cult. Jonathan). *J. Agric. Food. Chem.*, v. 38, p. 757–763.

Sestelo A. B. F., Poza M., Villa T. G. (2004). β -glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 20, p. 633-637.

Shanmugam V., Yadav K.D.S. (1995). Extracellular production of α -rhamnosidase by *Rhizopus nigricans*. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 33, p. 705–707.

Spagna G., Barbagallo R.N., Martino A., Pifferi P.G. (2000). A simple method of purifying glycosidase: α -L-rhamnopyranosidases from *Aspergillus niger* to increase the aroma of Moscato wine. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 27, p. 522–530.

Su E., Xia T., Gao L., Dai Q., Zhang Z. (2010). Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. *Food and Bioproducts Processing*, v.88, p. 83–89.

Sue M., Ishihara A., Iwamura H. (2000). Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereale L.*) seedlings. *Plant Science*, v. 155, p. 67-74.

Ting S.V. (1958). Enzymatic hydrolysis of naringin in grapefruit. *J. Agric. Food Chem.*, v. 6, p. 546–549.

Thomas D.W., Smythe C.V., Labbee M.D. (1958). Enzymatic hydrolysis of naringin, the bitter principle of grapefruit. *Food Res.*, v. 23, p. 591–598.

Tsen H.Y., Yu G.K. (1991). Limonin and naringin removal from grapefruit juice with naringinase entrapped in cellulose triacetate fibers. *J. Food Sci.*, v. 56, p. 31–35.

Tu M., Zhang X., Kurabi A., Gilkes N., Mabee W., Saddler J. (2006). Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. Lett.*, v. 28, p. 151-156.

Urrego, S., Serra, E., Alfredsson, V., Blanco R.M., Diaz, I. (2010). Bottle-around-the-ship: A method to encapsulate enzymes in ordered mesoporous materials. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 129, p. 173-178.

Williams P.J., Sefton M.A., Francis I.L., (1992). Glycosidic precursors of varietal grape and wine flavor, Flavor Precursors, *ACS Symp. Series* 490, 74.

Williams P.I., Strauss C.R., Wilson B., Massy Weststapp R.A. (1982). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochem.*, v. 21, p. 2013-2020.

Winterhalter P. (1990). Bound Terpenoids in the Juice of Purple Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims). *J. Agric. Food Chem.*, v. 38, p. 452-455.

Yadav S., Yadav K.D.S. (2001). Immobilization of α -L-rhamnosidase by *Aspergillus terreus* MTCC-3374 on bagasse particles based matrix. *Indian J. Chem. Technol.* v. 8, p. 314-318.

Yadav S., Yadav K.D.S. (2000). Secretion of α -L-rhamnosidases by *Aspergillus terreus* and its role debittering of orange juice. *J. Sci. Ind. Res.*, v. 59, p. 1032-1037.

Yu H., Gong J., Zhang C., Jin F. (2002). Purification and characterization of ginsenoside- α -L-rhamnosidase. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 52, p. 175-178.

Yanai T., Sato M. (2000). Purification and characterization of α -L-rhamnosidase from *Pichia angusta* X349. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000;v. 64, p. 2179–2185.

Yoshinobu T., Takashi K., Takahisa N., Hiroshi T., Shigetaka O. (1995). Prevention of hesperidin crystal formation in canned mandarin orange syrup and clarified orange juice by hesperidin glycosides. *Food Sci. Technol. Int.*, v. 1, p. 29–33.

Zhao D., Huo Q., Feng J. Chmelka B.F., Stucky G.D. (1998). Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant synthesis of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *J.Am.Chem.*, v. 120, p. 6024-6036.

Zverlov V.V., Hertel C., Bronnenmeier K., Hroch A., Kellermann J., Schwarz W.H. (2000). The thermostable α -L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercoararium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial α -L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. *Mol. Microbiol.*, v. 35, p. 173–179.

INDICE

1. Scopo del lavoro e articolazione della ricerca	pag. 2
1.1 Il pastazzo di agrumi	pag. 2
1.2 Citrus flavonoids: espidina e naringina	pag. 3
1.3 Ruolo delle glicosidasi: α -L-rhamnosidasi e β -D-glucosidasi	pag. 4
2. La biotecnologia	pag. 8
2.1 Cos'è la biotecnologia?	pag. 8
2.2 I processi fermentativi	pag. 9
2.3 Gli enzimi e le biotecnologie	pag. 10
2.4 Gli enzimi: caratteristiche generali	pag. 10
2.4.1 La struttura degli enzimi	pag. 11
2.4.2 La classificazione degli enzimi	pag. 12
2.4.3 Il complesso enzima-substrato	pag. 13
2.4.4 Il sito attivo e il modello della chiave-serratura	pag. 13
2.5 Le idrolasi	pag. 14
2.6 Le glicosidasi di origine fungina	pag. 14
2.7 α -L-ramnosidasi	pag. 15
2.7.1 Caratteristiche generali	pag. 15
2.7.2 Alcune applicazioni	pag. 16
2.8 β -D-glucosidasi	pag. 16
2.8.1 Caratteristiche generali	pag. 16
2.8.2 Alcune applicazioni	pag. 17
3. Stato dell'arte	pag. 18
3.1 α -L-ramnosidasi	pag. 18
3.2 Fonti di α -L-ramnosidasi	pag. 18
3.3 Purificazione e caratterizzazione dell' α -L-ramnosidasi	pag. 19
3.4 Applicazioni biotecnologiche dell' α -L-ramnosidasi	pag. 21
3.5 β -D-glucosidasi	pag. 22
3.6 Fonti di β -D-glucosidasi	pag. 23
3.7 Caratterizzazione e immobilizzazione della β -D-glucosidasi	pag. 24
4. Immobilizzazione enzimatica	pag. 25
4.1 Un po' di storia	pag. 25
4.2 Vantaggi e svantaggi dell'immobilizzazione	pag. 25
4.3 Tecniche di immobilizzazione	pag. 26
5. Materiali e metodi	pag. 29
5.1 Materiale reagente e apparecchiature	pag. 29
5.1.1 Formulazione del terreno di coltura	pag. 29
5.1.2 Strumentazione	pag. 29

5.1.3 Substrati e reattivi per l'analisi enzimatica e del contenuto proteico	pag. 29
5.1.4 Inibitori	pag. 29
5.1.5 Tamponi utilizzati	pag. 30
5.1.6 Ceppi fungini	pag. 30
5.1.7 Supporti per la purificazione	pag. 30
5.1.8 Supporti per l'immobilizzazione enzimatica	pag. 30
5.2 Metodologie analitiche	pag. 31
5.2.1 Messa a punto della fermentazione per la produzione di α -L-ramnossidasi e β -D-glucosidasi con l'impiego di induttori naturali	pag. 31
5.2.2 Preparazione dei terreni	pag. 31
5.2.3 Determinazione delle attività α -L-ramnosidasica e β -D-glucosidasica	pag. 31
5.2.4 Caratterizzazione chimico-fisica e cinetica dell' α -L-ramnosidasi e della β -D-glucosidasi	pag. 32
5.2.5 Determinazione della v_{max} e della K_m di α -L-ramnosidasi e della β -D-glucosidasi	pag. 32
5.2.6 Stabilità nelle condizioni ottimali	pag. 32
5.2.7 pH ottimale	pag. 33
5.2.8 Temperatura ottimale	pag. 33
5.2.9 Inibizione da glucosio, ramnosio, fruttosio e acido ascorbico per α -L-ramnosidasi e β -D-glucosidasi	pag. 33
5.2.10 Determinazione delle proteine	pag. 33
5.2.11 Purificazione	pag. 34
5.2.12 Inattivazione termica	pag. 34
5.2.13 Immobilizzazione	pag. 34
6. Risultati e discussioni	pag. 35
6.1 Scelta del ceppo fungino migliore	pag. 35
6.2 Caratterizzazione della α -L-ramnosidasi e della β -D-glucosidasi	pag. 35
6.2.1 Determinazione dei parametri cinetici v_{max} e K_m	pag. 42
6.2.2 Determinazione del pH ottimale	pag. 42
6.2.3 Determinazione della temperatura ottimale	pag. 42
6.2.4 Stabilità in condizioni ottimali	pag. 51
6.2.5 Inibizioni da zuccheri e acido ascorbico	pag. 51
6.2.5.1 Inibizione da glucosio	pag. 51
6.2.5.2 Inibizione da fruttosio	pag. 51
6.2.5.3 Inibizione da ramnosio	pag. 57
6.2.5.4 Inibizione da acido ascorbico	pag. 57
6.2.6 Purificazione	pag. 57
6.2.7 Immobilizzazione	pag. 62

7. Conclusioni	pag. 64
Abstract 1	pag. 67
Abstract 2	pag. 70
Poster 1	pag. 72
Poster 2	pag. 74
Poster 3	pag. 76
Bozza articolo	pag. 78
Bibliografia	pag. 86