



DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE DEGLI ALIMENTI - XIX CICLO.**

**‘Ri-utilizzo dei reflui dei frantoi oleari per la
produzione biotecnologica di lipasi
microbiche’**

BIO/19

Coordinatore: Prof. Marco Esti

Tutor: Dott.essa Silvia Crognale

Dottoranda: Viviana Brozzoli

Al mio tesoro, Giona

INDICE

RIASSUNTO	I
ABSTRACT	VI
1. INTRODUZIONE	1
1.1 LIPASI MICROBICHE	1
1.1.1 Caratteristiche della reazione delle lipasi	2
1.1.2 Specificità di substrato delle lipasi microbiche	3
1.1.3 Produzione di lipasi microbiche	6
1.1.4 Applicazioni industriali delle lipasi microbiche	9
1.1.5 Lipasi da <i>Penicillium</i>	15
1.1.6 Lipasi da <i>Candida</i>	18
1.2 PRODUZIONE OLEARIA	23
1.2.1 Il ciclo produttivo del frantoio oleario	23
1.2.2 Sistemi di estrazione dell'olio	24
1.2.3 Sottoprodotti dell'estrazione dell'olio	25
1.2.4 Composizione delle acque di vegetazione	26
1.2.5 Eco-tossicità delle acque di vegetazione	28
1.2.6 Aspetti tecnico-economici dello smaltimento delle acque di vegetazione	32
1.2.7 Quadro normativo	33
1.2.8 Tecnologie adottabili per lo smaltimento delle acque reflue di frantoi	35
1.2.9 Riutilizzo e valorizzazione dei reflui oleari	35
2. SCOPO DEL LAVORO	42
3. MATERIALI E METODI	45
3.1 PROVE DI FERMENTAZIONE	45
3.1.1 Approvvigionamento e caratteristiche del refluo	45
3.1.2 Microrganismi utilizzati e mantenimento dei ceppi	46
3.1.3 Terreni colturali	47
3.1.4 Condizioni colturali	48
3.1.5. Ottimizzazione del terreno colturale per la produzione di lipasi da <i>Penicillium citrinum</i> : disegno fattoriale	52
3.2 METODI ANALITICI	55
3.2.1 Determinazione della biomassa	55
3.2.2 Determinazione dell'attività enzimatica	55
3.2.3 Determinazione della domanda chimica di ossigeno (COD)	56
3.2.4 Determinazione degli zuccheri totali	57
3.2.5 Determinazione dei fenoli totali	58
3.2.6 Determinazione dell'olio nelle AV	58
3.2.7 Determinazione degli acidi uronici	59
3.2.8 Determinazione del pH	60
3.2.9 Determinazione delle proteine totali	60
3.2.10 Elettroforesi in presenza di SDS (SDS-PAGE), in condizioni native (NATIVE-PAGE) e in condizioni parzialmente denaturanti e non riducenti su gel di poliacrilammide	60

3.2.11 Isoelettrofocalizzazione analitica su gel di poliacrilammide (IEF- PAGE)	62
3.2.12 Colorazione per attività del gel di poliacrilammide	63
3.2.13 Colorazione per proteine del gel di poliacrilammide	63
3.2.14 Determinazione del peso molecolare	64
3.2.15 Determinazione del punto isoelettrico	64
3.2.16 Analisi statistica dei dati	64
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	67
4.1 MESSA A PUNTO DEL DOSAGGIO DELL'ATTIVITA' LIPOLITICA	68
4.2 SELEZIONE DI CEPPI FUNGINI PRODUTTORI DI LIPASI SU ACQUE DI VEGETAZIONE (AV)	70
4.3 EFFETTO DI DIVERSE TIPOLOGIE DI AV SULLA PRODUZIONE DI LIPASI	74
4.5 EFFETTO DELLA FONTE AZOTATA SULLA PRODUZIONE DI LIPASI	75
4.6 EFFETTO DELL'AGGIUNTA DI OLIO SULLA PRODUZIONE DI LIPASI	82
4.7 PRODUZIONE DI LIPASI DA <i>PENICILLIUM CITRINUM</i> NRRL 1841 COLTIVATO SU UN TERRENO A BASE DI ACQUE DI VEGETAZIONE	94
4.7.1 Scelta delle AV	94
4.7.1 Ottimizzazione della composizione del terreno colturale per la produzione di lipasi da <i>P. citrinum</i> coltivato su un terreno a base di AV mediante disegno fattoriale	95
4.7.2 Produzione di lipasi da <i>P. citrinum</i> coltivato sul terreno ottimizzato a base di AV in bioreattore	111
4.8 PRODUZIONE DI LIPASI DA <i>CANDIDA CYLINDRACEA</i> NRRL Y-17506 COLTIVATA SU UN TERRENO A BASE DI ACQUE DI VEGETAZIONE	115
4.8.1 Scelta delle AV	116
4.8.2 Effetto dell'aggiunta di diverse concentrazioni di olio di oliva	117
4.8.4 Effetto del Tween 80	122
4.8.5 Effetto dell'aggiunta di glucosio	124
4.8.6 Effetto dell'aggiunta di diversi fattori di crescita	126
4.8.7 Effetto della velocità di agitazione e delle condizioni di aerazione in beuta	128
4.8.8 Produzione di lipasi da <i>C. cylindracea</i> coltivata sul terreno ottimizzato a base di AV in bioreattore ad agitazione meccanica (stirrer tank reactor, STR)	131
4.8.9 Caratterizzazione del profilo isoenzimatico sul campione grezzo da <i>C. cylindracea</i> cresciuto sul terreno a base di AV ottimizzato in STR	141

5. CONCLUSIONI	149
6. BIBLIOGRAFIA	153
7. RINGRAZIAMENTI	177

RIASSUNTO

Lo smaltimento delle acque di vegetazione dei frantoi oleari costituisce, attualmente, uno dei principali problemi dal punto di vista ambientale, specialmente nei paesi del Mediterraneo dove si concentra la maggior parte della produzione mondiale di olio di oliva.

Le acque di vegetazione sono tra i reflui agro-industriali a più alto tasso inquinante a causa del loro elevato carico organico, caratterizzato soprattutto da composti fenolici e polifenolici ad elevata azione antimicrobica e fitotossica.

La purificazione biologica delle acque di vegetazione è particolarmente difficile poiché questo refluo presenta solidi in sospensione e un elevato carico organico, in particolare polifenoli con attività biostatica e/o biocida, che riduce fortemente le prestazioni degli impianti di depurazione. Di conseguenza, l'impianto deve prevedere due o più stadi di trattamento che rendono la depurazione complessa e costosa.

Attualmente, la normativa vigente consente la pratica dello spandimento delle acque di vegetazione sui terreni agrari; nonostante questo risulti, al momento, essere la soluzione migliore sia dal punto di vista pratico che economico, trova attuazione solo se si ha disponibilità di terreni sufficientemente vicini su cui spargere il refluo e comunque deve essere applicata in maniera controllata dal momento che gli eventuali effetti positivi o negativi sulla composizione, sulla carica microbica e la fertilità del terreno sono ancora oggi oggetto di studio. Inoltre, la migrazione di alcuni composti negli strati più bassi del terreno potrebbe causare la contaminazione di eventuali falde acquifere sottostanti con conseguenze per la salute dell'uomo.

Negli ultimi anni sono state proposte soluzioni alternative finalizzate a sfruttare questo refluo, in quanto ricco di composti utili. La valorizzazione delle AV mediante il loro impiego per l'ottenimento di prodotti a medio o alto valore aggiunto attraverso processi fisico-chimici o fermentativi, riveste notevole interesse scientifico.

Nelle AV sono presenti una grande varietà di biomolecole come acidi organici, polialcoli, zuccheri semplici e complessi e lipidi che le rendono una possibile base per i processi fermentativi. In virtù del contenuto residuo di lipidi, le AV potrebbero rappresentare un ottimo candidato come terreno liquido di crescita per la produzione di lipasi microbiche.

Lo scopo della presente tesi di dottorato è stato quello di mettere a punto un processo fermentativo per la valorizzazione delle AV mediante produzione microbica di enzimi,

in particolare enzimi lipolitici, ottenendo al contempo un abbattimento, o quanto meno una riduzione, del loro potere inquinante.

Esiste una vasta bibliografia in cui viene presa in esame la produzione di lipasi da numerose specie microbiche tra cui *Penicillium* e *Candida* e sia il terreno che il processo fermentativo per la produzione di questo enzima è stato ampiamente ottimizzato. Nella maggior parte dei casi, una buona produzione di lipasi microbica prevede l'utilizzo di terreni sintetici piuttosto complessi che sicuramente incidono in maniera significativa sul prezzo finale del prodotto. Inoltre, negli ultimi anni anche la produzione di preparati enzimatici commerciali contenenti lipasi di origine microbica ha avuto un notevole sviluppo. Sigma, Amano, Roche, Novo Nordisk, etc., forniscono preparati lipolitici con varie composizioni e proprietà catalitiche utilizzati in diversi settori: industria alimentare, farmaceutica, dei detergenti e per la produzione di biodiesel.

L'innovazione che dovrebbe introdurre questo lavoro è l'opportunità di produrre lipasi microbiche di possibile interesse industriale utilizzando un substrato costituito da un refluo agro-industriale. Con questa idea, si è cercato di mettere a punto un terreno di produzione a basso costo che permettesse di ottenere buoni livelli di attività e contemporaneamente un abbattimento del carico inquinante del refluo finale.

In prima battuta, è stato effettuato uno screening di microrganismi (*Geotrichum candidum*, NRRL 552, 553; *Rhizopus* sp, ISRIM 383; *Rhizopus arrhizus*, NRRL 2286; *Rhizopus oryzae*, NRRL 6431; *Aspergillus oryzae*, NRRL 1988, 495; *Aspergillus niger*, NRRL 334; *Candida cylindracea*, NRRL Y-17506; *Penicillium citrinum*, NRRL 1841, 3754, ISRIM 118) in grado di crescere sulle acque di vegetazione producendo lipasi. Le produzioni più elevate di enzima sono state ottenute, in condizioni non-ottimizzate, dopo 168 h con *Geotrichum candidum* NRRL 553 (0,521 U/ml) e *Candida cylindracea* (0,460 U/ml). Inoltre, livelli di produzione molto interessanti sono stati raggiunti dopo 72 h con i ceppi di *Penicillium citrinum* (0,365, 0,320 e 0,375 U/ml per NRRL 1841, NRRL 3754 e ISRIM 118, rispettivamente). Questi ceppi sono stati selezionati per valutare, in via preliminare, l'effetto di alcuni fattori sulla produzione di lipasi quali tipologia di AV, utilizzo di vari oli come induttori di attività e impiego di diverse fonti di azoto. Per quanto riguarda la produzione di lipasi da *P. citrinum* NRRL 1841 su AV, l'attività è stata influenzata in maniera marcata dal tipo di fonte di azoto ma non era aumentata in maniera significativa dall'aggiunta di oli. Nel caso della produzione di lipasi da *C. Cylindracea* NRRL Y-17506, il cloruro di ammonio e l'olio di oliva

rappresentavano rispettivamente la fonte di azoto e l'induttore più adatto; infatti questo ceppo cresciuto in condizioni parzialmente ottimizzate produceva 9,48 U/ml di attività lipolitica dopo 264 h di fermentazione.

Successivamente, la produzione di lipasi da *P. citrinum* NRRL 1841, utilizzando il terreno a base di AV, è stata ottimizzata in beuta valutando l'effetto del pH iniziale, della concentrazione di azoto e di estratto di lievito secondo un approccio multifattoriale. La combinazione ottimizzata dal modello è stata la seguente: pH 6,15, 2,7 g/l NH₄Cl e 1,1 g/l YE. La produzione massima raggiunta è stata di 1,242 U/ml. Con il terreno così ottimizzato, al fine di ottenere informazioni sul possibile trasferimento di scala del processo, sono stati condotti altri esperimenti in reattori da banco. Allo scopo, sono stati impiegati due tipi di sistemi, un bioreattore ad agitazione meccanica (STR) e uno ad agitazione pneumatica (Air-lift). In entrambi i casi, l'attività lipolitica extracellulare aveva raggiunto il suo picco massimo dopo 192 h di fermentazione. Tuttavia, il massimo di attività è stato significativamente più alto in STR che in Airlift (0,700 vs 0,420 U/ml, rispettivamente).

Sebbene tutti i ceppi studiati sono stati in grado di crescere sulle acque di vegetazione e produrre a livelli significativi attività lipolitica, una particolare attenzione è stata riservata a *C. cylindracea* (noto anche come *C. rugosa*) per il notevole interesse applicativo della lipasi prodotta da questo lievito. Inizialmente, si è cercato di ottimizzare in beuta la composizione del terreno di produzione (concentrazione dell'olio di oliva, effetto del glucosio, aggiunta di surfactanti e di vari fattori di crescita) e di valutare in via preliminare l'effetto sulla crescita cellulare e sull'attività di alcune condizioni colturali quali velocità di agitazione e aerazione. La migliore composizione del terreno di produzione si è confermata essere quella contenente 3 g/l di olio di oliva, 2,4 g/l di NH₄Cl e 0,5 g/l di estratto di lievito, senza l'aggiunta di glucosio e Tween 80. Inoltre, con lo scopo di valutare la fattibilità tecnica di un trasferimento di scala del bioprocesso e approfondire la messa a punto del processo fermentativo sono stati condotti una serie di esperimenti in bioreattore da banco ad agitazione meccanica (STR). In particolare, utilizzando il terreno a base di AV ottimizzato, si è cercato di ottimizzare alcuni parametri quali pH, velocità di agitazione e aerazione. Per quanto riguarda l'effetto della velocità di agitazione e dell'aerazione sulla produzione enzimatica, sono state prese in esame tre velocità di agitazione (300, 500 e 700 giri/min), mantenute fisse durante tutta la fermentazione, e in più è stato condotto un esperimento in cui si è cercato di mantenere la concentrazione dell'ossigeno disciolto

nel mezzo superiore al 20% di saturazione facendo variare la velocità di agitazione tra 300 e 800 giri/min. Mentre per valutare l'effetto del pH, sono stati condotti degli esperimenti a pH 6,5 fisso confrontando la produzione con quella ottenuta a pH libero e a pH mantenuto inferiore a 6,5.

La massima produzione di lipasi da *C. cylindracea* è stata ottenuta in bioreattore lavorando a pH libero e ad una velocità di agitazione costante di 500 giri/min (18,50 U/ml) o ad una velocità di agitazione variabile tra 300 e 800 giri/min in modo da assicurare un valore di ossigeno disciolto nel brodo superiore al 20% di saturazione (18,70 U/ml); in quest'ultimo caso, inoltre, la comparsa del picco massimo è stata anticipata nel tempo favorendo così la produttività oraria del bioprocesso. Per quanto riguarda i reattori a 300 e 700 giri/min, la produzione enzimatica è stata di 2,54 e 11,65 U/ml, rispettivamente.

Infine, messo a punto il bioprocesso di produzione della lipasi da *C. cylindracea* coltivata su un terreno a base di AV, si è cercato di identificare il profilo enzimatico del campione grezzo così ottenuto, dal momento che, come è noto dalla letteratura, questo lievito è in grado di produrre fino a sette isoforme ad attività lipolitica. A tale scopo sono stati condotti degli esperimenti di isoelettrofocalizzazione (IEF) analitica. Nel gel sono stati caricati un campione di lipasi commerciale (Tipo VII, Sigma) e due campioni grezzi ottenuti da *C. cylindracea* coltivata sul terreno a base di AV, prelevati a due tempi fermentativi diversi e corrispondenti ai due picchi di attività lipolitica raggiunti durante le prove in STR (I° e II° picco di massima attività, 48^{esima} e 192^{esima} ora, rispettivamente). Dai risultati ottenuti, è stato osservato che il campione grezzo era costituito da più isoenzimi con attività lipolitica e che il profilo isoenzimatico aveva una sola banda in comune con quello della lipasi commerciale (Tipo VII, Sigma) a cui è stato assegnato pI 4,7. Per quanto riguarda il campione prelevato alla 48^{esima} ora, sono state osservate anche una banda piuttosto intensa a pI 5,1 e una tripletta di bande più deboli a pIs di 5,06, 5,0 e 4,9. Durante la fermentazione il profilo isoenzimatico del campione aveva subito delle modifiche: infatti, alla 192^{esima} ora, le bande a pIs 5,1, 5,0 e 4,9 erano scomparse, mentre era comparsa una banda di attività intensa a cui è stato assegnato un pI di 4,5. Infine, in entrambi i campioni grezzi è stata rilevata una banda tenue a pI 3,8.

In conclusione, i buoni livelli di attività enzimatica raggiunti dimostrano la fattibilità tecnica di un processo fermentativo finalizzato alla valorizzazione dei reflui oleari mediante la produzione di lipasi, che può avere promettenti utilizzi in varie applicazioni

industriali. Comunque, ulteriori fasi di scale-up del processo sono ancora necessarie al fine di poter effettuare una valutazione sulla fattibilità economica del processo.

ABSTRACT

The olive mill wastewater (OMW) disposal is, currently, one of the main environmental problems in all olive-oil producing countries, especially in the Mediterranean area. In fact, for its high organic load, phenolic fraction with phytotoxic effects and antimicrobial activity, the OMW is a highly polluted agro-industrial effluent.

The biological treatment can be very difficult since solid residues, high organic load and phenols may strongly reduce the depuration efficiency. Consequently, a possible process should include several technological options, physical, chemical and biological, as well as combinations thereof, thus resulting in increased process costs.

At the moment, the Italian legislation allows land spreading of untreated olive mill wastewater that is the best economical solution. Application on agriculture soils is a practice which solves partially the problem of OMW disposal. Positive and negative effects on soil composition and fertility are still under study, so that OMW application must be strictly controlled. Land spreading, in fact, may cause serious negative environmental impact regarding, for instance, groundwater contamination.

In the last years, alternative solutions have been proposed in view of the use this waste as a source of valuable compounds. Several recent research studies have reported the possibility of OMW valorization to obtain products of actual or potential industrial interest.

The presence in OMW of a wide range of biomolecules such as organic acids, polyalcohols, simple and complex sugars and lipids makes it a potential basis for fermentation processes. In this way, OMW could be a putative candidate as a potentially suitable liquid growth medium for the production of microbial lipases by virtue of its residual lipid content.

For these reasons, the objective of the present PhD thesis was to assess the suitability of OMW as growth medium for the production of lipases and to set up a related fermentation process that might lead, at the same time, to a low polluting load final effluent.

A large number of microbial strains have been screened for lipase production belonging to several fungal genera, *Candida* and *Penicillium* in particular. In literature, numerous methods for lipolytic enzyme production are published and medium composition and cultural conditions have been fully optimised. Nevertheless, the most frequently used medium is a chemical defined and complex one, significantly affecting the final product costs. Besides, in the last years, a whole range of microbial lipase preparations has been

developed. Sigma, Amano, Roche, Novo Nordisk, etc., provide lipolytic preparations with various compositions and catalytic proprieties employed in areas such as detergent pharmaucetic and food industries and biodiesel production.

Our innovative approach consists in the trial of producing microbial lipases using an agroindustrial-waste based medium. Our basic idea, in fact, was that of developing a low cost production medium.

Firstly, 12 fungal strains belonging to well-known lypolytic species (*Geotrichum candidum*, NRRL 552, 553; *Rhizopus* sp, ISRIM 383; *Rhizopus arrhizus*, NRRL 2286; *Rhizopus oryzae*, NRRL 6431; *Aspergillus oryzae*, NRRL 1988, 495; *Aspergillus niger*, NRRL 334; *Candida cylindracea*, NRRL Y-17506; *Penicillium citrinum*, NRRL 1841, 3754, ISRIM 118) were screened for their ability to grow on undiluted OMW and to produce extracellular lipase activity. The highest lipase productions were obtained under non-optimized conditions after 168 h with *Geotrichum candidum* NRRL 553 (0.521 U/ml) and *Candida cylindracea* (0.460 U/ml). Interesting production levels were also achieved after 72 h with strains of *Penicillium citrinum* (0.365, 0.320 and 0.375 U/ml for NRRL 1841, NRRL 3754 and ISRIM 118, respectively). These strains were then selected to study the effect of culture conditions, such as OMW typology, nitrogen sources and inducers, on the enzyme production.

With regard to the lipase production by *P. citrinum* NRRL 1841, the enzyme activity was significantly influenced by nitrogen addition; on the other hand, the addition of oils resulted in a marked increase in biomass without affecting, however, lipase production.

Lipase production by *C. cylindracea* NRRL Y-17506 was significatly favored by ammonium salts and oil addition. This strain growth in OMW medium containing ammonium chloride and olive oil led to an activity peak of 9.48 U/ml after 264 hours of fermentation.

In order to optimise lipase production by *P. citrinum* in OMW-based medium, the combined effect of three variables (i.e, concentration of NH_4Cl , yeast extract and initial pH) was assessed using a multi-factorial design with ‘optimizer’ function of ‘Modde 5.0’ program. The optimised combination by the model was as follows: pH 6.15, 2.7 g/l NH_4Cl e 1.1 g/l extract yeast. The maximum lipase activity was 1.242 U/ml after 192 hour of fermentation. To gain information on the possible up-scaling of the process, further experiments were performed in 3-l laboratory-scale reactors. Specifically, pneumatically agitated (Airlift) and mechanically agitated (STR) reactors were employed using the optimised OMW-based medium. In both cases, the extracellular

lipase peaked 192 h after inoculation. However, the maximum activity was significantly higher in STR with respect to the Airlift (0.700 vs 0.420 U/ml, respectively).

Of all strains, *C. cylindracea* appeared to be particularly interesting and was, therefore, used as the model microorganism to further investigate the feasibility of an OMW substrate. Firstly, the optimisation of medium composition was assessed in shaken cultures. In particular, the effects on the lipase production of olive oil concentration (1, 3, 5 e 10 g/l), glucose (5 g/l), Tween 80 (0,5 g/l) and several growth nutrients (yeast extract, malt extract and peptone) addition were studied. The best medium composition was as follows: diluted OMW (1:2), olive oil 3 g/l, NH₄Cl 2.4 g/l and yeast extract 0.5 g/l. The glucose and Tween 80 addition negatively affected the production of lipolytic enzyme.

Lipase production by *C. cylindracea* on OMW-optimized medium was subsequently assessed in mechanically agitated bioreactor (STR). To study the agitation influence on enzyme production, a set of experiments was carried out at three impeller speed, 300, 500 and 700 rpm; moreover, an additional experiment was carried out at dissolved oxygen DO > 20% saturation (agitation speed automatically controlled between 300 and 800 rpm). To evaluate the effect of pH, three conditions were compared: free pH; fixed pH (6.5) maintained constant by addition of HCl 4.0 M and NaOH 4.0 M; pH lower than 6.5 controlled with addition of HCl 4.0 M. The maximum lipase productions were obtained with the pH left free to vary, 500 rpm constant agitation speed (18.5 U/ml) and variable agitation speed between 300 and 800 rpm to ensure a dissolved oxygen value upper to 20% (18.7 U/ml); in the latter thesis the onset of enzyme activity was anticipated thus leading to increased bioprocess productivity. At 300 e 700 rpm agitation speed, the maximum lipase productions were 2.54 and 11.65 U/ml, respectively.

Finally, to set up the bioprocess of lipase production by *C. Cylindracea* grown on OMW-based medium, the isoenzymatic profiles of the raw sample was evaluated. This aspect appears to be very interesting since it is known that commercial *C. rugosa* lipase is a mixture of 3 isoenzymes namely Lip 1, Lip2 and Lip 3 but the yeast is able to produce up to seven different isoenzymes (Lip 1-Lip 7). Moreover isoenzymatic profiles can depend on media composition and fermentation conditions. With this aim, a set of analytical isoelectrofocusing experiments were carried out. In the gels, a sample of commercial lipase (Type VII, Sigma) and two raw samples of lipase by *C. cylindracea* grown on OMW-optimized medium and corresponding to two lipolytic

activity peaks (1st and 2nd peak, 48^{esime} and 192^{esime} hour of fermentation, respectively) obtained in STR, were loaded. The results suggest that the raw samples were constituted of more lipolytic isoenzymes with the isoenzymatic profile having only one band in common with that of the commercial lipase (assigned pI 4.7). The sample corresponding to the 1st activity peak showed a strong band at pI 5.1 and a triplete of weak bands at pIs 5.06, 5.0 e 4.9. Moreover, the isoenzymatic profiles changed during fermentation; in fact, the bands at pIs 5.1, 5.0 and 4.9 disappeared and a new strong band at pI 4.5 formed. Finally, in both raw samples a band at pI 3.8 was observed.

OMWs valorisation by its use as growth medium for lipase production by *C. cylindracea* NRRL Y-17506 and *P. citrinum* NRRL 1841 appears to be possible and promising. Moreover, the investigation for further up-scaling is need to evaluate the economic fattibility of the bioprocess.

1. INTRODUZIONE

1.1 LIPASI MICROBICHE

Gli enzimi sono considerati come “i catalizzatori della natura”. Oggi, la maggior parte degli enzimi vengono prodotti attraverso processi fermentativi. Gli enzimi microbici sono spesso più utili rispetto a quelli derivati da piante e animali per la varietà di attività catalitiche disponibili, per le alte produzioni possibili, la facilità con cui possono essere manipolati geneticamente, la regolare disponibilità dovuta all'assenza di fluttuazioni stagionali e la rapida crescita dei microrganismi anche su substrati a basso costo. Inoltre, gli enzimi microbici sono più stabili di quelli ottenuti da animali e piante, e la loro produzione è più conveniente e sicura. Solo il 2% dei microrganismi sono stati testati come fonti di enzimi. In genere, si utilizzano i batteri perché rispetto ai lieviti permettono di ottenere attività più alte, hanno pH ottimali neutri o alcalini e sono più termostabili. Le modificazioni delle condizioni colturali e le manipolazioni genetiche per aumentare la resa delle cellule, per aumentare l'attività enzimatica o per produrre enzimi modificati, possono essere impiegate facilmente usando cellule microbiche grazie ai loro corti tempi di generazione, alle semplici richieste nutrizionali e alla disponibilità di diverse tecniche di screening per le caratteristiche desiderate. La presenza di lipasi era già stata osservata nel 1901 per *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* e *B. fluorescens* che oggi rappresentano i batteri produttori di lipasi meglio studiati e che ora sono chiamati *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. fluorescens*, rispettivamente (Eijkman, 1901; Hasan et al., 2006). Gli enzimi in grado di idrolizzare i trigliceridi vengono studiati da più di trecento anni e l'abilità delle lipasi di catalizzare l'idrolisi e la sintesi di esteri è stata riconosciuta da almeno 70 anni (Van der Walle, 1927). Tradizionalmente, le lipasi venivano ottenute dal pancreas degli animali e usate come digestivi per consumo umano sia in miscela grezza con altre idrolasi sia purificate. L'iniziale interesse per le lipasi microbiche è nato a causa delle difficoltà incontrate nel disporre di quantità adeguate di pancreas. Le lipasi possono essere ottenute da animali e piante, ma sono state trovate anche in un gran numero di specie microbiche, batteri, funghi e lieviti. Questi enzimi conferiscono ai microrganismi la capacità di utilizzare oli e grassi naturali come fonte di carbonio per la crescita, poiché sono responsabili della degradazione di tali substrati (Hasan et al., 2006).

Una “vera” lipasi (triacil-glicerol-ester-idrolasi EC 3.1.1.3) è definita come carbossilesterasi che catalizza l'idrolisi di trigliceridi in acidi grassi liberi e glicerolo;

questa reazione è reversibile e l'enzima è in grado di catalizzare la formazione di acil-gliceroli da glicerolo ed acidi grassi. Queste reazioni di esterificazione sono probabilmente di scarso significato nella biosintesi dei lipidi ma, possono essere utilizzate nella produzione di grassi modificati o esteri di acidi grassi. Le lipasi possiedono la caratteristica di divenire pienamente attive solo in presenza di un' interfaccia tra fase acquosa e fase organica. Questo fenomeno noto come attivazione interfacciale coinvolge un riarrangiamento nella molecola di lipasi dove gli elementi strutturali (lids or flaps) dovrebbero muoversi per permettere al substrato di accedere al sito attivo dell'enzima (Holmquist, 1998).

Gli enzimi lipolitici , attualmente, stanno attirando enorme interesse grazie al loro potenziale biotecnologico. Le lipasi microbiche costituiscono un importante gruppo di enzimi. Innanzitutto, mostrano una spiccata selettività per il substrato (chemioselettività, regioselettività, stereoselettività), sono facilmente ottenibili da produzione microbica, in particolare da funghi e batteri, e infine, sono in grado di catalizzare reazioni eterogenee, non solo all'interfaccia substrato solubile-insolubile, ma anche in solventi organici (Gulati et al., 1999; Jaeger & Eggert, 2002).

Queste caratteristiche hanno permesso un ampio utilizzo della lipasi come biocatalizzatore per molte applicazioni industriali soprattutto nel campo alimentare (oli, grassi, produzioni casearie), farmaceutico e dei detergenti e per promettenti impieghi nell'ambito delle biotecnologie (Moriguchi et al., 1990; Nishioka et al., 1990; Li & Ward, 1993; Kamini & Iefuji, 2001; Hsu et al., 2002; Gupta et al., 2003; Macedo et al., 2003; Patel, 2003; Whiteley et al., 2003; Soumanou & Bornscheuer, 2003; Zorn et al., 2003; Annenkov et al., 2004; Du et al., 2004; Ghamgui et al., 2004; Lara & Park, 2004; Larios et al., 2004; Pastorino et al., 2004; Wu & Tsai, 2004; Mittal et al., 2005; Noureddini et al., 2005; Zhang et al., 2005; Palocci et al., 2007).

1.1.1 Caratteristiche della reazione delle lipasi

Il meccanismo di reazione delle lipasi è diverso da quello delle altre esterasi (Sarda & Desnuelle, 1958). In particolare, gli enzimi lipolitici agiscono adsorbiti all'interfaccia idrofobica/idrofilica dove, al contrario, le esterasi sono inattive (Sugiura & Isobe, 1975). Di conseguenza, le lipasi e le esterasi avranno una diversa affinità per i vari substrati lipidici. I substrati naturali delle lipasi sono i trigliceridi di acidi grassi a lunga catena caratterizzati da una solubilità in acqua estremamente bassa. Mentre questi enzimi mostrano una bassa attività idrolitica su acil gliceroli a corta catena solubili in acqua. I

substrati delle lipasi sono esteri di acidi grassi in uno stato di emulsione, di micelle o di film monomolecolari. Il primo step della reazione, prima della formazione del complesso enzima-substrato, è l'adsorbimento dell'enzima sulla superficie del substrato. L'azione catalitica procede all'interfaccia e infine l'enzima è rigenerato dalla liberazione del prodotto. Invece, le esterasi sono inattive alla superficie e non sono adsorbite all'interfaccia. Dunque, la reazione avviene in soluzione acquosa e sono buoni substrati gli esteri dispersi nella fase acquosa (Sugiura & Isobe, 1975).

In conclusione, le lipasi catalizzano rapidamente l'idrolisi di legami esterei all'interfaccia tra la fase insolubile del substrato e la fase acquosa nella quale l'enzima è solubile (fase eterogenea).

Il fatto che la reazione catalizzata da lipasi avvenga sull'interfaccia olio-acqua crea delle difficoltà nel saggio e nell'analisi cinetica della reazione. Infatti, la cinetica enzimatica convenzionale è stata sviluppata per reazioni in soluzioni acquose in cui sia l'enzima sia il substrato sono solubili (fase omogenea).

Durante i dosaggi della lipasi, la presenza di sostanze che alterano l'area superficiale disponibile modificano la velocità di reazione osservata. Gliceridi parziali (mono e diacil-gliceroli) e saponi di acidi grassi liberi che sono formati durante la lipolisi sono attivi superficialmente (ossia agiscono come surfactanti) e tenderanno ad accumularsi e a bloccare l'interfaccia olio-acqua. Questo significa che è spesso difficile ottenere delle condizioni di reazione tali che la velocità di reazione si mantenga costante in un periodo di tempo che è conveniente per la sua misurazione. Aggiunte di materiali che, o modificano lo stato di aggregazione del substrato (per esempio sali), o l'area superficiale disponibile (per esempio detergenti), possono avere un effetto marcato sulla velocità di reazione osservata.

1.1.2 Specificità di substrato delle lipasi microbiche

Specificità di posizione. Le lipasi microbiche possono essere divise in due gruppi sulla base della loro specificità di posizione, ossia il legame estereo del trigliceride che idrolizzano preferenzialmente. Al primo gruppo appartengono le lipasi non specifiche, le quali rilasciano acidi grassi da tutte e tre le posizioni della molecola di glicerolo. Queste lipasi catalizzano la completa rottura di trigliceridi in acidi grassi liberi e glicerolo, sebbene gli 1,2(2,3)-digliceridi, 1,3-digliceridi e monogliceridi appaiano come intermedi. Un esempio di lipasi aspecifica, è quella prodotta da *Candida*

cylindracea che, a pH 8 e a 37°C, è molto attiva su trigliceridi a lunga catena, e idrolizza tutte e tre le catene aciliche del glicerolo senza riguardo per la loro posizione (Benzonana & Esposito, 1971). Il secondo gruppo (lipasi 1,3-specifiche) rilasciano acidi grassi solo dalle posizioni 1- e 3- della molecola di glicerolo. Con queste lipasi, i trigliceridi sono idrolizzati in acidi grassi liberi, 1,2-(2,3-) digliceridi che a loro volta sono convertiti a 2-monogliceridi. In virtù dell'instabilità chimica degli intermedi di reazione (1,2(2,3)-digliceridi e 2-monogliceridi), l'incubazione prolungata di un grasso con una lipasi 1,3-specifica può dar luogo ad una completa idrolisi (Macrae, 1983). A questo secondo gruppo appartiene la lipasi pancreatica che ha una elevata specificità per il primo legame estereo (Entressangles et al., 1966; Brockeroff, 1968, 1969, 1970).

Specificità determinata dalla catena acilica. La specificità non è soltanto determinata dalla posizione in cui la lipasi idrolizza il legame, ma anche dalla lunghezza della catena acilica dell'acido grasso, dal grado di insaturazione e dalla configurazione del doppio legame (cis-trans).

Un confronto tra le proporzioni delle catene di acidi grassi nell'olio di oliva e nell'olio di burro di cacao e le proporzioni degli acidi grassi liberati dopo una parziale idrolisi di questi lipidi mostra che la lipasi ottenuta da *C. cylindracea* libera acido palmitico e acido oleico prima dell'acido stearico, se sono presenti insieme in un gliceride, e l'acido oleico è liberato prima dell'acido palmitico, senza tener conto della loro posizione nel gliceride (Benzonana & Esposito, 1971). Il sito attivo di *Candida rugosa* è coperto da una struttura ad α -elica composta di amminoacidi con proprietà anfifiliche chiamati lid o flap. La composizione amminoacidica del lid è molto variabile fra gli isoenzimi ed è cruciale per l'attivazione interfacciale e di conseguenza per l'attività enzimatica e/o l'enantioselettività. Tutte le idrolasi hanno una struttura conservata chiamata cavità α/β -idrolasi (Ollis et al., 1992). All'interno di questa struttura, le lipasi da *C. rugosa* e *Geotrichum candidum* presentano il sito attivo (Ser-Glu-His). Per entrambi i microrganismi il tunnel per il riconoscimento della catena del substrato inizia dalla serina e si estende all'interno del lid ed ha una forma ad L adatta ad accogliere l'acido oleico. Per questo motivo la lipasi da *C. rugosa* è non specifica verso acidi grassi a lunga catena mentre ha una bassa attività quando gli acidi grassi a lunga catena vengono convertiti (Dominguez de Maria et al., 2006).

Sono state isolate e caratterizzate diverse lipasi da diverse fonti. La maggior parte degli enzimi ha massa molecolare di 30-40 KDa mentre le lipasi da *G. candidum* (GCL) e da

C. rugosa (CRL) sono più grandi (Mw di circa 60 KDa). La lipasi da *C. rugosa* mostra una maggiore enantioselettività verso gli enantiomeri degli esteri degli acidi carbossilici 2-sostituiti rispetto alle lipasi più piccole ottenute da *Mucor miehei* (MML) e *Humicola lanuginosa* (HLL) (Mw 30 KDa). Inoltre, il sito attivo di CRL è localizzato più in profondità nella proteina rispetto a MML e HLL. La presenza di un sito di legame, per i gruppi acilici, a tunnel e le dimensioni più grandi della proteina creano una struttura dove l'interazione substrato-proteina si può formare lungo l'intero gruppo acilico del substrato. Questo spiegherebbe perché la lipasi da *C. rugosa* ha una enantioselettività più alta verso gruppi acilici chirali rispetto alle lipasi con un sito attivo più superficiale (Holmquist, 1998).

Le lipasi sono utilizzate come biocatalizzatori molto versatili nella moderna chimica organica (Kazlauskas & Bornscheuer, 1998; Schmid & Verger, 1998), soprattutto per l'arricchimento in acidi grassi da una miscela di acidi grassi (esteri) attraverso idrolisi, esterificazioni e transesterificazioni (Mukherjee, 1990). Borgdorf & Warwell (1999) hanno condotto degli studi tesi a verificare la selettività di substrato di diverse lipasi microbiche verso acidi grassi insaturi non coniugati. In particolare, hanno studiato la reazione di esterificazione dell'acido oleico (9*c*-18:1), dell'acido linoleico (9*c*, 12*c*-18:2), dell'acido linolenico (9*c*, 12*c*, 15*c*-18:3), dell'acido elaidico (9*t*-18:1), dell'acido linolelaidico (9*t*, 12*t*-18:2) e dell'acido linolenelaidico (9*t*, 12*t*, 15*t*-18:3) con n-butanolo in n-esano. Gli esperimenti hanno dimostrato che la lipasi da *C. cylindracea* e da *Mucor miehei* ha una preferenza per gli acidi grassi contenenti un doppio legame *cis*- in posizione Δ9 mentre la lipasi da *Candida antarctica* ha una preferenza per l'esterificazione del doppio legame *trans*- in posizione Δ9.

Successivamente Borgdorf & Warwell (2000) ha condotto degli esperimenti simili con lo scopo di studiare la selettività di substrato di diverse lipasi microbiche verso acidi grassi insaturi coniugati, in particolare verso l'esterificazione degli isomeri dell'acido linoleico coniugato. Gli isomeri presi in esame sono stati i seguenti: *cis*-9,*trans*-11-, *cis*-9,*cis*-11-, *trans*-9,*trans*-11 e *trans*-10,*cis*-12- dell'acido ottadecadienoico con n-butanolo in n-esano. Questo studio ha messo in evidenza che la lipasi da *C. cylindracea* e *M. miehei* catalizza più velocemente l'esterificazione dell'isomero *cis*-9,*trans*-11- mentre *C. antarctica* quella dell'isomero *trans*-9,*trans*-11-. Per valutare l'effetto della natura della porzione acilica in acilgliceroli sulla specificità di substrato di una lipasi, l'attenzione deve essere posta sui substrati e sulle condizioni utilizzate per garantire che i cambiamenti nelle relative velocità di reazione risultino da alterazioni nella struttura

dei gruppi acilici grassi e non da altri effetti. Infatti, i risultati ottenuti sono difficili da interpretare poiché i trigliceridi degli acidi grassi saturi a catena lunga sono solidi alle normali temperature di saggio, mentre quelli degli acidi grassi insaturi e degli acidi grassi saturi a catena corta e media sono liquidi. È stato dimostrato che i trigliceridi solidi sono solo lentamente idrolizzati dalle lipasi microbiche (Sugiura & Isobe, 1975). Di conseguenza, è stato supposto che esteri alchilici semplici di acidi grassi (ad esempio metil esteri), possano essere substrati idonei a questo scopo. La loro idrolisi è catalizzata da lipasi microbiche, sebbene la velocità di reazione è di solito lenta rispetto a quella ottenuta con i trigliceridi.

Specificità per l'idrolisi di parziali gliceridi. Alcune lipasi microbiche, come quelle di *Penicillium cyclopium* (Okumura et al., 1980) idrolizzano preferenzialmente gliceridi parziali (mono e diacil-gliceroli). È stato mostrato come l'impiego di lipasi di questo tipo, congiuntamente a lipasi convenzionali sia in grado di portare ad un'idrolisi totale del trigliceride più efficiente di quanto non riescano a fare isolatamente i due enzimi.

1.1.3 Produzione di lipasi microbiche

Le lipasi commerciali sono ottenute dal pancreas di bovini e maiali, e da ceppi del lievito *Candida* e delle muffe appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* (Huge-Jensen et al., 1988; Benjamin & Pandey, 1996; Pokorny et al., 1997; Dalmau et al., 1998). Diversi metodi utilizzati per la produzione di lipasi microbiche prevedono l'impiego di diversi tipi di colture. La produzione industriale di lipasi microbiche può essere ottenuta coltivando il microrganismo desiderato in colture semisolide o più tradizionalmente in colture sommerse.

Alcuni autori riportano l'uso di colture semisolide (Aunstrup, 1979; Rivera-Munoz et al., 1991; Bushan et al., 1994; Cordova et al., 1998; Kamini et al., 1998). Di solito, non è necessario avere lipidi nel terreno di produzione, ed è stato suggerito che, in alcune fasi colturali, essi possano comportare una repressione nella sintesi dell'enzima. La lipasi può essere recuperata come sottoprodotto della produzione di rennina microbica da *M. miehei* mediante adsorbimento su minerali argillosi (Ward, 1985). Un recente studio condotto su un ceppo di *Mucor*, identificato come *Mucor* sp. isolato dalla palma da frutto, ha dimostrato che la lipasi poteva essere prodotta, in assenza di lipidi, in batch: l'aggiunta di olio nel liquido di coltura, non aumentava la produzione. Ad ogni modo, il sistema di sintesi dell'enzima sembrava essere stimolato, su mezzo solido,

dalla presenza di una piccola quantità di olio di palma (Abbas et al., 2002). Un altro studio condotto sul ceppo di *Aspergillus niger* NCIM 1207 ha evidenziato che la produzione di lipasi era stimolata sia in coltura sommersa che in coltura solida dalla presenza di un substrato lipidico. In particolare, l'attività più alta era ottenuta in coltura solida usando crusca di grano in combinazione con olio di oliva come substrato (Mahadik et al., 2002).

In letteratura sono stati pubblicati diversi metodi per la produzione dell'enzima in colture sommerse. La composizione del terreno di produzione e le condizioni colturali variano ampiamente ma è possibile trovare alcune caratteristiche comuni. La formazione di lipasi è spesso repressa dalla presenza di mono- o di- saccaridi o glicerolo nel mezzo di crescita. Questo fenomeno è stato illustrato con la produzione di lipasi da *G. candidum* fatto crescere su glucosio. Un'apprezzabile produzione di lipasi avveniva solo dopo che il glucosio veniva esaurito nel mezzo e la crescita era quasi cessata (Macrae, 1983). Effetti simili sono stati osservati anche con *Rhizopus japonicus* (Aisaka & Terada, 1979), *Candida paralipolytica* (Sugiura & Isobe, 1975), *Aspergillus terreus* (Macris et al., 1996) e *C. rugosa* (Valero et al., 1991; Lotti et al., 1998; Dalmau et al., 2000; Muralidhar et al., 2001).

Aggiunte di lipidi al terreno di crescita determinano un sostanziale aumento nella produzione di lipasi, e questo effetto è stato osservato per un elevato numero di specie microbiche. Ad esempio, l'aggiunta di oli vegetali o acidi grassi a colture liquide di *G. candidum* (Iwai et al., 1973) e *Pseudomonas mephitica* (Kosugi et al., 1971), determinano una notevole stimolazione della produzione di lipasi.

Un simile effetto, si può ottenere anche con aggiunte di acidi grassi e lecitina a colture liquide di *C. paralipolytica* (Sugiura & Isobe, 1975). Aggiunte di trigliceridi o lecitina al mezzo di crescita stimolano la produzione di lipasi da *R. japonicus*, ma con questo organismo gli acidi grassi sono apparentemente inefficaci (Aisaka & Terada, 1979). Comunque il mezzo di crescita utilizzato per la produzione di lipasi in grande quantità, in genere usa come fonte di carbonio un polisaccaride come l'amido o la crusca, trigliceridi o acidi grassi (Pokorny et al., 1994). Piccole quantità di glucosio possono essere usate per avviare la crescita.

Altra importante fonte di carbonio è costituita dagli oli. Importante è, in questo senso, l'utilizzo di olio di oliva. Substrati alternativi a questo sono anche olio di girasole, mais e sesamo. Effetti positivi sulla crescita ma soprattutto sulla produzione enzimatica sono stati ottenuti facendo crescere *A. terreus* su olio di mais (Gulati et al., 1999) e *Fusarium*

solani su olio di sesamo (Maia et al., 2001). Gli stessi studi hanno messo in evidenza l'incremento di produzione in presenza di ioni metallici in tracce, in particolare calcio e magnesio: infatti, questi ioni controllano il meccanismo di secrezione. Contrariamente, Tan et al. (2003) hanno dimostrato che gli ioni Ca^{2+} possono ridurre la produzione di attività lipolitica poiché questi ioni formano complessi con gli acidi grassi e modificano la loro solubilità e il loro comportamento all'interfaccia acqua-olio.

Comuni risorse di azoto sono farina di soia, peptone, estratto di lievito, caseina idrolizzata e "corn steep liquor". Studi condotti con *Penicillium citrinum* hanno evidenziato anche un marcato effetto della fonte azotata inorganica: il cloruro di ammonio era, tra le fonti saggiate, quella che meglio favoriva la produzione (Miranda et al., 1999).

In alcuni casi, materiali lipidici che sono presenti in piccole quantità nei costituenti del mezzo, come ad esempio farina di soia e crusca, possono essere efficaci nello stimolare la produzione di lipasi. In molti microrganismi una frazione significativa della lipasi extracellulare rimane adesa alle pareti cellulari; tale fenomeno può inibire un ulteriore rilascio dell'enzima nel terreno di crescita. Per ovviare a questi inconvenienti, possono essere impiegate delle sostanze che minimizzano tali fenomeni di adsorbimento. Ad esempio, l'aggiunta di un alto livello di ioni magnesio al terreno di crescita in colture di *G. candidum* determina un desorbimento della lipasi dalle pareti cellulari ed un considerevole aumento nella produzione dell'enzima. Aisaka & Tereda (1979) hanno suggerito che la stimolazione indotta dalla lecitina sulla produzione di lipasi extracellulare da *R. japonicus*, determini un'accelerazione del rilascio, piuttosto che incidere sulla velocità di sintesi dell'enzima.

L'effetto dei Tween e altri detergenti sulla produzione di lipasi è stato studiato su diversi microrganismi e i risultati ottenuti sono diversi. Concentrazioni di Tween 80 tra 0,5 e 2 g/l aumentano la produzione di lipasi da *Yarrowia lipolytica* senza modificare la concentrazione di biomassa (Corzo & Revah, 1999). Il Tween 80 è stato utilizzato per aumentare l'attività lipolitica extracellulare anche in culture cellulari di *Acinobacter calcoaceticus* 69V (Fischer & Kleber, 1987), *Humicola lanuginosa* (Omar et al., 1987), *Rhizopus oligosporus* (Nahas, 1988), *G. candidum* (Jacobsen et al., 1989), *Acremonium strictum* (Okeke & Okolo, 1990), *Bacillus* sp. (Handelsman & Shoham, 1994) e *C. rugosa* (Dalmau et al., 2000). D'altro canto, è stato osservato che il Tween 80 ha un effetto negativo sulla produzione di lipasi da *Baeuveria bassiana* (Hegedus & Khachatourians, 1988) e *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Lin et al., 1995).

Come riportano molti autori, la produzione microbica di lipasi per via fermentativa è influenzata, oltre che dalla composizione del terreno di coltura, da diversi fattori chimico-fisici quali pH, temperatura, aerazione e agitazione. Le condizioni di aerazione e agitazione riportate per la produzione di lipasi da funghi in bioreattore sono molto variabili: 750 rpm e 2 vvm, 400 rpm e 1 vvm, 200 rpm e 1 vvm e 80 rpm e 1 vvm sono utilizzati per *G. candidum*, *Geotrichum* sp, *H. lanuginosa* e *Rhizopus* sp, rispettivamente (Burkert et al., 2005). Elibol e Ozer (2000) hanno condotto una serie di esperimenti per valutare l'effetto dell'ossigeno sulla produzione di lipasi da *Rhizopus arrhizus* in bioreattore. In particolare, tale effetto è stato studiato operando sia in condizioni di concentrazione di ossigeno disciolto controllato che in condizioni di velocità di aerazione controllata. L'ossigeno influenza più la produzione di lipasi che la crescita cellulare. Inoltre, il fattore determinante è la velocità di trasferimento dell'ossigeno (OTR) piuttosto che la sua concentrazione (DO%). Miglioramenti in OTR, sia variando la velocità di agitazione che l'aerazione risultano in un aumento della produzione di lipasi. Infine, la produttività, definita come la pendenza della retta che congiunge l'origine al punto di massima attività lipolitica nella cinetica di produzione, dipende più dall'agitazione che dall'aerazione. Risultati identici sono stati ottenuti nella produzione di lipasi da *Acinetobacter radioresistent* (Chen et al., 1998).

Il passaggio di scala per la produzione di lipasi in coltura liquida è stata effettuato operando in sistemi batch, fed-batch e continui. In particolare, per quanto riguarda la produzione di lipasi da *C. rugosa*, la produttività massima è stata ottenuta in coltura continua; mentre la produzione più alta di attività è stata raggiunta operando in condizioni di fed-batch (Montesinos et al., 1997; Gordillo et al., 1998). Nella maggior parte dei lavori riportati in letteratura, per la produzione di enzimi lipolitici vengono impiegati bioreattori ad agitazione meccanica (STR) (Valero et al., 1988; Obradors et al., 1993; Gordillo et al., 1995; Dalmau et al., 2000; Tan et al., 2003; Puthli et al., 2006). Burkert et al. (2005) hanno condotto uno studio per confrontare la produzione di lipasi da *G. candidum* in STR e in un bioreattore ad agitazione pneumatica (Airlift). Da questo lavoro è emerso che in assenza di agitazione meccanica la stessa resa di lipasi viene raggiunta in meno tempo con un aumento del 60% della produttività.

1.1.4 Applicazioni industriali delle lipasi microbiche

Le lipasi microbiche costituiscono un importante gruppo di enzimi in campo industriale e nella moderna biotecnologia. Il loro vantaggio rispetto ai classici catalizzatori chimici

è che esibiscono ampia versatilità catalitica e specificità di substrato. Inoltre, operano in condizioni di reazione più blande e sono molto stabili in solventi organici. Tutte queste importanti caratteristiche favoriscono l'utilizzo di questi enzimi lipolitici in molti settori quali l'industria alimentare, farmaceutica, chimica, agrochimica e oleochimica, dei detergenti, dei cosmetici, dei profumi, dei tessili, della carta e della pelle; inoltre gli enzimi lipolitici hanno numerose applicazioni biomediche, come biosensori, per la produzione di biodiesel, per la produzione di biopolimeri e per il trattamento di reflui industriali (Pandey et al., 1999; Jaeger & Eggert, 2002; Hasan et al., 2006; Villeneuve, 2007).

Industria alimentare Nell'industria alimentare, gli enzimi lipolitici sono principalmente impiegati nei processi di ristrutturazione di oli e grassi in cui la loro regioselettività, cioè la preferenza per un certo tipo di acido grasso, permette la produzione di triacilgliceroli specifici con una predefinita distribuzione e composizione di acidi grassi. Come esempio si può citare la produzione assistita dalla lipasi di equivalenti di burro di cacao (Macrae, 1983) o di grassi a basso contenuto calorico (Foglia & Villeneuve, 1997). In aggiunta, le lipasi sono utilizzati nelle reazioni di lipofilizzazione cioè reazioni di esterificazione di zuccheri, amminoacidi, proteine e composti fenolici. Un esempio è la sintesi enzimatica di esteri dell'acido ascorbico che vengono utilizzati nel settore alimentare come antiossidanti; a tale scopo vengono utilizzate lipasi immobilizzate derivate da *C. antarctica* B, *Rhizomucor miehei*, *C. rugosa*, *G. candidum* e altre specie microbiche (Villeneuve, 2007).

Inoltre, le lipasi microbiche vengono aggiunte ai formaggi e a vari cibi per modificarne l'aroma e l'odore attraverso la sintesi di acidi grassi a corta catena, beta-cheto acidi, metil chetoni, esteri volatili, lattoni e alcoli, noti composti che conferiscono fragranza e aroma (Novo, 1985). In particolare, le lipasi ottenute da *Aspergillus* sono molto selettive per acidi grassi a corta catena e alcoli; le lipasi da *C. rugosa* sono più selettive per acido propionico, butirrico, butanolo, pentanolo e etanolo (Linko & Wu, 1996); infine, gli enzimi da *M. miehei* e *R. arrhizus* sono più selettivi per acidi a lunga catena e acetati (Langrand et al., 1990). Gli enzimi lipolitici sono molto utilizzati nell'industria lattiero-casearia per l'idrolisi del grasso del latte. Le correnti applicazioni includono l'aumento di aroma dei formaggi, l'accelerazione del processo di maturazione dei formaggi e la lipolisi di grasso di burro e creme. Gli acidi grassi liberi generati dall'azione delle lipasi sulla componente grassa del latte impartiscono soprattutto ai formaggi morbidi le loro

specifiche caratteristiche aromatiche. Così, l'aggiunta di lipasi che inizialmente rilasciano acidi grassi a corta catena (C4 e C6) sviluppano un sapore e un aroma intenso e pungente, mentre il rilascio di acidi grassi a media catena (C12 e C14) impartiscono ai prodotti una consistenza e un gusto saponoso. Sono state sviluppate molte preparazioni enzimatiche contenenti lipasi per la produzione di formaggi da diversi microrganismi: *M. miehei* (Piccnate, Gist-Brocades; Palatase M, Novo Nordisk), *A. niger* e *A. oryzae* (Palatase A, Novo Nordisk; Lipasi AP, Amano; Flavour AGE, Chr. Hansen) e altri. Le lipasi giocano un ruolo molto importante nella preparazione dei cosiddetti formaggi modificati enzimaticamente (EMC). EMC è un formaggio che viene incubato in presenza di enzimi ad elevate temperature con lo scopo di produrre un aroma concentrato per l'uso come ingrediente in altri prodotti (salse, sughi, condimenti, zuppe etc.) (<http://www.au-kbc.org/frameresearch.html>). Un altro esempio di applicazione di lipasi microbiche nell'industria dei formaggi è fornito dall'impiego dell'enzima prodotto da *Penicillium roqueforti* per lo sviluppo dell'aroma del formaggio blue o gorgonzola (Farahat et al., 1990).

L'uso di enzimi permette ai fornai di estendere la shelf-life del pane, aumentare e controllare l'imbrunimento non-enzimatico, aumentare il volume del pane e migliorare la struttura della mollica. Bio-Cat Inc., Enzyme Industry, Troy, VA, offre linee di prodotti enzimatici che possono aiutare in queste funzioni (Hasan et al., 2006). Anche la Novo Nordisk fornisce diversi preparati enzimatici di lipasi impiegate in questo settore: Lipopan 50 BG, Lipopan F BG e F conc. BG, Noopazyme ed altri (www.novozymes.com). Le lipasi da *A. niger*, *R. oryzae* e *C. cylindracea* sono usate anche nell'industria del pane.

Le lipasi sono anche usate nella produzione di carni di pesce più magre, il grasso è rimosso aggiungendo l'enzima durante il processamento e questa procedura è chiamata biolipolisi. Gli enzimi lipotici giocano un ruolo importante nei processi fermentativi delle salsicce e determinano cambiamenti negli acidi grassi liberati durante la loro maturazione. Infine, le lipasi di diverse origini microbiche sono usate per raffinare il sapore del riso, per modificare il latte di soia e per migliorare l'aroma e accelerare la fermentazione del vino di mela (Hasan et al., 2006).

Industria farmaceutica e applicazioni biomediche Le lipasi possono essere usate per risolvere miscele racemiche e come biocatalizzatori per sintetizzare intermedi chirali di

sintesi utili in campo farmaceutico, agrochimico e per la produzione di pesticidi (Kirchner et al., 1985).

La chiralità è un fattore chiave per l'efficacia di molte medicine. Le convenzionali reazioni chimiche di sintesi per i farmaci contengono in genere un centro chirale che porta alla formazione di una miscela di enantiomeri. Diversi studi hanno dimostrato che di solito l'attività terapeutica dei racemi risiede principalmente in uno dei due enantiomeri. Efficienti processi di risoluzioni catalizzati da lipasi microbiche vengono utilizzati per la preparazione di intermedi omochirali otticamente attivi per la sintesi di farmaci anti-infiammatori non steroideali, per la sintesi di lamuvidina, un potenziale agente antivirale che potrebbe essere impiegato contro l'HIV, e per la sintesi enantiospecifica di agenti anti-tumorali, alcaloidi, antibiotici e vitamine (Reddy, 1992; Tsai et al., 1996). Per esempio, il naproxene è un farmaco anti-infiammatorio non steroideale il cui enantiomero (S) è 28 volte più attivo del corrispondente enantiomero (R). Chang & Tsai (1997) hanno riportato un facile processo per la preparazione dell'estere dell'enantiomero (S) del naproxene in solventi organici in cui possono essere utilizzate lipasi microbiche. Hernaiz et al. (1997) hanno riportato due isoenzimi, A e B, da *C. rugosa* che sono stereoselettivi. Sebbene entrambe le isoforme esterificano l'enantiomero (S) dell'ibuprofene, la lipasi B è molto più stereoselettiva. Un ultimo esempio, ma se ne potrebbero citare molti altri, è la risoluzione racemica catalizzata dalla lipasi B da *C. antarctica* del 2 (S)-pentanolo, un intermedio chirale importante richiesto per la sintesi di un farmaco anti-Alzheimer's (Pandey et al., 1999; Hasan et al., 2006).

Altre applicazioni biomediche delle lipasi prevedono il loro utilizzo come digestivi (Gerhartz, 1990). A questo scopo si rivelano idonee quelle lipasi in grado di fronteggiare la notevole acidità dell'ambiente gastrico. Inoltre, le lipasi da *C. rugosa* sono state utilizzate per sintetizzare lavostatina, un farmaco in grado di abbassare il livello di colesterolo nel sangue (Hasan et al., 2006).

In campo medico, le lipasi possono anche essere utilizzate come strumento diagnostico e la loro presenza o gli aumentati livelli possono essere indicativi di alcune infezioni o malattie. Inoltre, possono essere usate come biosensori, per esempio nella determinazione dei trigliceridi e di colesterolo nel sangue (Karube & Sode, 1988; Imamura et al., 1989; Iwai, 1990). Le lipasi come biosensori sono impiegate non solo nelle diagnosi cliniche, ma hanno trovato anche altri orizzonti come l'industria

alimentare, l'analisi di inquinanti, soprattutto contaminazioni da pesticidi, e l'industria farmaceutica (Pandey et al., 1999).

Industria dei detergenti Il settore commercialmente più importante per l'applicazione delle lipasi idrolitiche è quello dei detergenti usati sia a livello casalingo che industriale. Per aumentare il potere detergente dei detersivi in genere oltre alle lipasi vengono aggiunti altri enzimi come le proteasi, le cellulasi e le amilasi (Ito et al., 1998). Le proteasi agiscono sulle proteine, le amilasi sull'amido e le cellulasi sulla peluria di cotone. Le lipasi idrolizzano i trigliceridi in mono- e di- gliceridi, glicerolo e acidi grassi liberi, composti più solubili in acqua rispetto alla componente grassa iniziale. Le lipasi dunque vengono utilizzate nella formulazione dei detergenti per rimuovere dalle superfici, dalle pelli e dai tessuti macchie di grasso risultanti da grassi fritti, dagli oli delle insalate, dal burro, dalle salsicce, dalle zuppe o da certi cosmetici. Già nel 1988, la Novo Nordisk aveva sviluppato una lipasi in grado di sciogliere le macchie di grasso. Questo enzima viene prodotto naturalmente da un ceppo del fungo *Humicola* ma in quantità troppo basse per le applicazioni commerciali. Il gene che codifica per questa lipasi allora è stato clonato e inserito in *A. oryzae* con una resa commercialmente rilevante. Nel 1994 la Novo Nordisk ha introdotto la prima lipasi commerciale, Lipolase, derivante dal fungo *Thermomyces lanuginoso* ed espressa in *A. oryzae*. Inoltre le lipasi aggiunte ai detergenti includono anche quelle derivanti da *Candida* e *Chromobacterium* (Pandey et al., 1999; Hasan et al., 2006).

La rimozione di depositi di oli e grassi è una applicazione molto attraente per le lipasi grazie alla loro adattabilità alle condizioni di lavaggio. Per poter essere additivi idonei per i detergenti, questi enzimi devono essere sia termofili che alcalofili, inoltre devono essere in grado di funzionare in presenza dei vari componenti della formulazione delle polveri di lavaggio.

Produzione di biopolimeri Le lipasi stanno diventando un gruppo di enzimi molto importante per la loro applicazione nelle sintesi organiche. Questi enzimi possono essere usati come biocatalizzatori nella produzione di composti polimerici biodegradabili come poliesteri, polisaccaridi e polifenoli. Per esempio, 1-butil oleato, usato per diminuire la viscosità di biodiesel, è stato prodotto per diretta esterificazione tra butanolo e acido oleico (Linko et al., 1998).

Produzione di biodiesel Il grande interesse per sorgenti di energia alternative nasce dal fatto che tutta l'energia consumata a livello mondiale deriva da fonti limitate e non rinnovabili. Una fonte energetica alternativa e rinnovabile è rappresentata dal biodiesel. Il biodiesel è molto simile al convenzionale diesel nelle sue caratteristiche primarie e i due carburanti possono essere miscelati in qualsiasi proporzione. Inoltre, il biodiesel presenta alcuni vantaggi rispetto al diesel quali minor impatto sul surriscaldamento globale del pianeta, minima emissione di particolato e di altri inquinanti come monossido di carbonio, biossido di zolfo e di composti alogenati (Hasan et al., 2006; Hernandez-Martin & Otero, 2008). Questo carburante consiste di esteri di acidi grassi formati da reazioni di transesterificazione tra oli vegetali (per es. olio di colza) o grassi animali e un alcol. Questa reazione può essere catalizzata in solventi organici dalla lipasi e consiste di un singolo step. Le lipasi utilizzate come biocatalizzatori possono essere ottenute da diversi microrganismi quali *C. antarctica*, *P. cepacea* e *T. lanuginoso*. Diversi autori hanno studiato la reazione di alcolisi di diversi oli vegetali (olio di ricino, di girasole, di soia e di oliva) utilizzando come biocatalizzatori dei preparati commerciali di lipasi immobilizzata, in particolare Novozym 435, Lipozyme TL IM e Lipozyme RM (Novozym A/S, Bagsvaerd, Danimarca) e Lipasi PS (AmanoEnzyme Inc., Nagoya, Giappone) (Hasan et al., 2006; Hernandez-Martin & Otero, 2008).

Biotrattamento dei reflui industriali Una emergente applicazione delle lipasi nel campo delle biotecnologie è il loro impiego per il trattamento e la valorizzazione dei reflui industriali. Per esempio, questi enzimi vengono impiegati (ex situ o in situ) per il biorisanamento delle acque di scarto (Dauber & Boehnke, 1993; Kurita-Water, 1994). Un metodo proposto è quello di coltivare direttamente microrganismi lipofili in questi reflui. Un'altra applicazione delle lipasi è la degradazione dei reflui dell'industria dei poliesteri in prodotti utili, in particolare per la produzione di acidi grassi non esterificati e lattoni. La produzione di "single cell protein" (SCP) da effluenti industriali con l'impiego di lieviti lipofili potrebbe essere un'altra prospettiva per l'applicazione delle lipasi in questo settore. Le lipasi vengono anche utilizzate per la degradazione dei contaminanti nelle acque di scarto contenenti lipidi o grassi come per esempio quelle provenienti dai caseifici, dai mattatoi o quelle derivanti dai processi di lavorazione delle olive per l'ottenimento dell'olio di oliva (Pandey et al., 1999; Cammarota & Freire, 2006).

Le lipasi sono utili anche nei trattamenti a fanghi attivi e in altri processi di degradazione aerobica delle acque di scarico, dove il sottile strato di grasso deve essere continuamente rimosso dalla superficie delle vasche areate per permettere il trasporto di ossigeno. Questo liquido ricco di grassi viene digerito con le lipasi (Bailey & Ollis, 1986).

1.1.5 Lipasi da *Penicillium*

Diversi funghi sono stati presi in esame come fonti di lipasi tra cui quelli appartenenti al genere *Penicillium*: *P. citrinum*, *P. restrictum*, *P. candidum*, *P. cyclopium*, *P. camembertii*, *P. roqueforti* e altri (Rivera-Munoz et al., 1991; Pimentel et al., 1997; Freire et al., 1997; Gombert et al., 1999; Miranda et al., 1999; Tan et al., 2004; de Azaredo et al., 2007). Sono stati condotti molti studi al fine di definirne le migliori condizioni nutrizionali e culturali. Sono state valutate diverse fonti di carbonio, fonti di azoto organiche ed inorganiche, alcuni induttori, l'effetto di alcuni sali minerali, il pH, la temperatura e altro.

Sztajer & Maliszewska (1989) hanno valutato l'effetto sulla produzione di lipasi da *P. citrinum* di zuccheri semplici e complessi quali arabinosio, cellobiosio, fruttosio, galattosio, glucosio, xilosio, maltosio, mannitolo, lattosio, saccarosio e amido alla concentrazione del 2%. L'attività più alta è stata raggiunta usando come fonte di carbonio l'amido. Nel caso di *P. camembertii*, tra 13 carboidrati presi in esame, invece, lattosio e mannitolo sono quelli con cui è stata raggiunta l'attività lipolitica più alta (Tan et al., 2004).

Grassi e oli naturali sono in grado di aumentare in maniera significativa l'attività lipolitica. Sono in grado sia di supportare la crescita che la produzione di enzima; dunque, possono essere utilizzati sia come fonte di carbonio che come induttori in presenza di un'altra fonte di carbonio. Per esempio, nello stesso lavoro citato in precedenza, Sztajer & Maliszewska (1989) hanno preso in esame la possibilità di aggiungere al terreno di coltura contenente amido, sali minerali ed estratto di lievito, degli induttori come tributirina, olio di oliva, olio di colza, olio di girasole e olio presenti in effluenti di scarto. In queste condizioni, il miglior induttore è stato l'olio di colza (contenente elevati valori di trioleina). Utilizzando invece olio di oliva, olio di soia o olio di mais direttamente come fonti di carbonio, in assenza di zuccheri, l'attività lipolitica da *P. citrinum* più alta è stata ottenuta con olio di oliva (Pimentel et al., 1997). De Azaredo et al. (2007) hanno confrontato diverse fonti di carbonio, tra carboidrati e

lipidi, per la produzione di lipasi da *P. restrictum*. Dopo l'aggiunta di fonti di C facilmente assimilabili come acido oleico e glucosio, e fonti di C più complesse come olio di oliva e amido, sono stati osservati comportamenti fisiologici molto diversi. La produzione massima è stata raggiunta, anche in questo caso, con olio di oliva.

Elevate concentrazioni di azoto nel mezzo di coltura influenzano positivamente la produzione di lipasi microbiche (Petrovic et al., 1990; Druet et al., 1992; Ohnishi et al., 1994). Poiché la fonte di azoto inorganica viene utilizzata più velocemente, mentre la fonte organica può fornire fattori di crescita per la cellula, entrambe sono necessarie in un terreno colturale. Confrontando diverse fonti di azoto per la produzione di lipasi da *Penicillium* in coltura sommersa emerge che, tra le fonti organiche, il peptone è uno di quelli che permette di raggiungere i migliori risultati forse per il fatto che contiene diversi amminoacidi e co-fattori che soddisfano le richieste fisiologiche per la produzione dell'enzima (Sztajer & Maliszewska, 1989; Freire et al., 1997). Non bisogna però generalizzare troppo perché per esempio per la produzione di lipasi da *P. camembertii* Thom la migliore fonte organica di azoto è rappresentata dalle farine dei semi di soia, mentre il peptone ha un effetto simile ad altre fonti di N come corn steep liquor ed estratto di lievito. Tra le fonti inorganiche di N, le più utilizzate per la produzione di lipasi da *Penicillium* sono solfato d'ammonio e cloruro di ammonio. In particolare, per la produzione enzimatica da *P. citrinum*, il cloruro di ammonio è più efficace (Miranda et al., 1999). Da diversi lavori invece emerge che l'urea ha un effetto inibitorio sull'attività lipolitica (Sztajer & Maliszewska, 1989; Miranda et al., 1999; Tan et al., 2004).

Diversi autori hanno preso in esame la produzione di lipasi da *P. restrictum* e hanno condotto vari studi tesi a valutare le migliori condizioni colturali (Freire et al., 1997; Gombert et al., 1999; de Azeredo et al., 2007). Una particolare attenzione è stata rivolta all'influenza del rapporto C/N sulla produzione enzimatica aggiungendo al substrato di base, costituito da cacao di babassu, differenti fonti di carbonio e azoto e in diverse percentuali (1% peptone, 1 e 2% olio di oliva, 2 e 4% di amido). Nel terreno arricchito con azoto l'attività enzimatica è stata circa 4 volte più elevata di quella raggiunta con il terreno base. Le attività lipolitiche più elevate sono state raggiunte con peptone (C/N 11,7) e 2% olio di oliva (C/N 14,1) e sono state di 27,8 U/g e 30,3 U/g, rispettivamente. Aggiungendo il 2% di amido al terreno base (C/N 14,1) si è raggiunto il 50% dell'attività ottenuta con il 2% di olio cioè con lo stesso rapporto C/N. Dunque, la produzione di lipasi non è tanto influenzata da C/N quanto dal tipo di sostanza utilizzata

per arricchire il terreno (Gombert et al., 1999). In conclusione, un arricchimento con trigliceridi determina un significativo aumento nella produzione di enzimi lipolitici da *P. restrictum*, lo stesso risultato è confermato dal lavoro di de Azeredo et al. (2007). Invece, la presenza di amido e di glucosio, liberato dalla degradazione dell'amido, ha un effetto inibitorio. Questo fenomeno è stato osservato anche quando *P. restrictum* viene coltivato in terreno liquido (Freire et al., 1997; de Azeredo et al., 2007).

Gli ioni metallici influenzano la sintesi di lipasi: Pimentel et al. (1997) hanno studiato l'effetto della presenza/assenza di Fe^{2+} e di diverse concentrazioni di K^+ sulla produzione di lipasi da *P. citrinum* coltivato su un terreno contenente olio di oliva, ammonio solfato e sali minerali. In assenza di ione ferroso dal terreno di coltura la produzione lipolitica si riduce del 50%. Inoltre, concentrazioni di ioni potassio inferiori a 30 mM favoriscono l'attività lipolitica mentre concentrazioni superiori la inibiscono. L'effetto di alcuni sali minerali è stato valutato anche da Tan e al. (2004) per la produzione di lipasi da *P. camembertii*. L'aggiunta di MgSO_4 , Na_2HPO_4 e K_2HPO_4 non influenzano in maniera significativa la produzione di lipasi rispetto al controllo privo di tali sali, mentre gli ioni Ca^{2+} e gli ioni Fe^{2+} inibiscono la produzione. In questo caso però il substrato utilizzato, farine di semi di soia, oltre ad essere una fonte di C e di N, contiene trigliceridi e diversi sali minerali. Dunque gli ioni Ca^{2+} e Fe^{2+} possono complessare gli acidi grassi ionizzati cambiandone la solubilità e il comportamento all'interfaccia olio-acqua, mentre aggiunte ulteriori degli altri sali non sono necessarie perché le quantità opportune sono già presenti nel substrato.

Per la produzione di lipasi da *Penicillium* sono stati presi in esame anche parametri come la temperatura e il pH. Sztajer & Maliszewska (1989) riportano che la migliore attività lipolitica si ha quando il pH del mezzo è 7,2 e la temperatura è bassa (22 e 28°C). Gombert et al. (1999) hanno notato che il pH durante la fermentazione varia da 5,0 a 8,0 e che il massimo di attività si ha a pH tra 5,0 e 6,0. Anche Tan e al. (2004) hanno osservato che il pH durante la fermentazione varia e che a pH superiori a 7,5 l'attività enzimatica si riduce.

La produzione di lipasi ottenuta da processi fermentativi condotti su terreni solidi si è sviluppata soprattutto in quest'ultimo ventennio e sono stati presi in esame diversi microrganismi (Rao et al., 1993; Ohinishi et al., 1994; Christen et al., 1995; Kamini et al., 1998; Mahadik et al., 2002; Rodriguez et al., 2006; Mahanta et al., 2008) tra cui quelli appartenenti al genere *Penicillium*. In diversi casi, la produzione in coltura solida si è dimostrata migliore di quella in coltura liquida. Per esempio, Rivera-Munoz et al.

(1991) dapprima hanno valutato la capacità di alcuni funghi lipolitici, come *P. candidum*, *P. camembertii* e *M. miehei*, a produrre enzimi lipolitici in coltura solida; successivamente hanno condotto uno studio teso a confrontare la produzione di lipasi da *P. candidum* in coltura sommersa e in coltura solida. Come fonte di carbonio e di azoto hanno utilizzato crusca di grano. Inoltre, il substrato è stato arricchito con alcuni sali di potassio e di magnesio. Il terreno liquido aveva la stessa composizione di quello solido eccetto per l'aggiunta di acqua. Dai risultati è emerso che la produzione dell'enzima era più elevata e più stabile in coltura solida. Anche per quanto riguarda la produzione di lipasi da *P. restrictum*, coltivando il fungo su un substrato solido, in particolare cacao di babassu, è stata ottenuta una produzione enzimatica, intesa in questo caso come produttività, migliore rispetto a quella raggiunta in coltura liquida (Freire et al., 1997; Gombert et al., 1999). Dunque, la fermentazione in stato solido rappresenta una promettente alternativa al sistema liquido sia per quanto riguarda la produttività sia perché utilizza substrati derivanti da scarti industriali.

1.1.6 Lipasi da *Candida*

Tra i vari organismi, il genere *Candida* riveste un ruolo molto importante nella produzione di lipasi. In particolare *C. rugosa* è un ben noto produttore industriale di lipasi. Sono stati condotti numerosi studi al fine di definirne le condizioni nutrizionali e di coltura ottimali. I fattori che influiscono sulla produzione di lipasi sono: il tipo e la concentrazione della fonte di carbonio e dell'induttore, il pH, la temperatura e la concentrazione di ossigeno disciolto (Benjamin&Pandey, 1996; Lotti et al., 1998; Gulati et al., 1999; Dalmau et al., 2000; Dominguez de Maria et al., 2002 e 2005a; Montesinos et al., 2003; Tan et al., 2003; Puthli et al., 2006).

La produzione di lipasi da *Candida* prevede l'utilizzo come fonte di carbonio e come induttore di lipidi o sostanze correlate (trigliceridi, acidi grassi, etc.) in presenza/assenza di altre fonti di carbonio come per esempio gli zuccheri. L'effetto di questi componenti è stato studiato da molti gruppi di ricerca. Dalmau et al. (2000) hanno dimostrato che alcuni substrati come carboidrati e acidi non correlati agli acidi grassi favoriscono la crescita di *Candida* ma la produzione di lipasi è nulla o molto bassa. In particolare, arabinosio e xilosio, acido ossalico, e alcuni alcoli non vengono usati dal microrganismo come fonte di carbonio; glucosio, glicerolo, sorbitolo, acido acetico, lattico, citrico e succinico supportano la crescita ma la produzione di enzima è nulla; invece, con galattosio e mannitolo si rileva, anche se bassa, attività lipolitica. Per

contro, emerge che substrati lipidici inducono la produzione di lipasi e, tra tutti, gli acidi grassi rappresentano i migliori induttori. La combinazione di due substrati come glucosio ed acido oleico non migliora la produzione di lipasi che risulta repressa dalla presenza dello zucchero (repressione da catabolita). Lotti et al. (1998) studiando la sintesi e la secrezione della lipasi da *C. rugosa* hanno dimostrato che i geni che codificano per la lipasi possono essere divisi in due classi, una espressa in maniera costitutiva e l'altra indotta dagli acidi grassi. La sintesi inducibile dell'enzima è inibita a livello della trascrizione con l'aggiunta di glucosio e al contrario l'acido oleico sembra ostacolare la sintesi costitutiva. L'effetto inibente del glicerolo e del glucosio è stato dimostrato anche da altri autori (del Rio et al., 1990; Valero et al., 1991).

Differenti acidi grassi come acido butirrico (C4), valerico (C5), caproico (C6), ettanoico (C7), caprilico (C8), caprico (C10) e oleico (C18) sono stati testati per valutare l'effetto inducente sulla produzione di lipasi da *C. rugosa*. Questi substrati sono stati aggiunti ad un terreno di base costituito da sali, micronutrienti e vitamine a tre differenti concentrazioni e come unica fonte di carbonio. L'acido butirrico è un buon substrato per la crescita cellulare ma non induce attività lipolitica. Anche l'acido caproico è un buon substrato per la crescita ed inoltre induce attività lipolitica. L'acido caprilico (0,5/1,0/2,0 g/l) e l'acido caprico (0,2/0,5/1,0 g/l) sono induttori migliori (7,41/5,23/0 e 3,48/6,68/0 U/ml, rispettivamente) rispetto all'acido caproico (4,06/4,46/0,70 U/ml), però a concentrazioni superiori ad 1 g/l diventano tossici per il microrganismo. Il migliore substrato sia per la crescita di *Candida* che per la produzione di lipasi (8,0 U/ml) è risultato essere l'acido oleico (Obradors et al., 1993) ed esiste un'ampia bibliografia a conferma che il migliore induttore in assoluto per la produzione di lipasi da *C. rugosa* è questo acido grasso (del Rio., 1990; Gordillo et al., 1995 e 1998; Sanchez et al., 1999a,b; Ferrer et al., 2001; Dominguez de Maria et al., 2002 e 2005a; Montesinos et al., 2003).

E' stato inoltre visto che la concentrazione iniziale di acido oleico, come fonte di carbonio e come induttore, ha un effetto importante sui livelli finali di enzima. In colture batch, la massima produttività è stata ottenuta ad una concentrazione iniziale di acido oleico di 2 g/l, mentre a concentrazioni superiori a 8 g/l la produttività decresce (Gordillo et al., 1995).

Molti studi hanno messo in evidenza che anche l'olio di oliva rappresenta un buon substrato di crescita e di produzione di lipasi con *C. rugosa* (Valero et al., 1988 e 1991; del Rio et al., 1990; Benjamin&Pandey, 1996; Muralidhar et al., 2001). Il meccanismo

di reazione durante la crescita di questo lievito su olio di oliva prevede che una piccola quantità di lipasi già presente nel terreno (fornita per esempio dall'inoculo) dovrebbe portare all'idrolisi del trigliceride in glicerolo e acidi grassi. Il lievito, in prima battuta, dovrebbe usare la fonte di carbonio più facilmente assimilabile, il glicerolo, che quindi ritarda l'utilizzo degli acidi grassi. Dunque, la produzione di enzima a livelli più elevati dovrebbe essere associata al consumo di acidi grassi (del Rio, 1990). Uno studio condotto sulla produzione di lipasi da *C. rugosa* ha dimostrato che aggiungendo al terreno UY (Universal Yeast) concentrazioni crescenti di olio di oliva (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 15%) la produzione di lipasi aumenta fino ad un massimo di 8,36 U/ml, in corrispondenza del 10% di olio nel mezzo, per poi raggiunge il plateau a concentrazioni superiori (Benjamin & Pandey, 1996).

Altri buoni induttori per la produzione di lipasi da *C. rugosa* sono l'1-dodecanolo e il colesterolo (Valero et al., 1988; Dominguez de Maria, 2002 e 2005a).

E' ben noto che alcuni composti come surfactanti e detergenti possono aumentare la permeabilità delle cellule di lievito facilitando il trasporto di diversi composti attraverso la membrana cellulare. Dunque, è probabile che aggiungendo al terreno di coltura Tween o agenti simili, oltre ad indurre la sintesi della lipasi possano facilitarne la secrezione extracellulare. Questo effetto è stato osservato per la produzione di lipasi da *C. rugosa* aggiungendo nel mezzo liquido Tween80 e Span60 (Ota et al., 1968; Dalmau et al., 2000; Lotti et al., 2001; Dominguez de Maria, 2002, 2005a).

Alcuni autori hanno dimostrato che la presenza nel terreno di crescita di ioni metallici, come Mg^{2+} e Ca^{2+} , aumenta la produzione di lipasi: infatti, questi ioni controllano il meccanismo di secrezione (Gulati et al., 1999). Contrariamente, Tan et al. (2003) hanno dimostrato che gli ioni Ca^{2+} possono ridurre la produzione di attività lipolitica da *Candida* sp. coltivata su un terreno contenente olio di soia e farina di soia poiché questi ioni formano complessi con gli acidi grassi e modificano la loro solubilità e il loro comportamento all'interfaccia acqua-olio.

I processi fermentativi per la produzione microbica di lipasi sono influenzati anche da fattori quali agitazione e aerazione. Diversi autori hanno dimostrato che la presenza di aria è essenziale per la produzione di lipasi da *C. rugosa*: in particolare, una concentrazione elevata di ossigeno nel mezzo è fondamentale per la crescita cellulare e, di conseguenza, per la produzione dell'enzima (Puthli et al., 2006). Tan et al. (2003), hanno osservato che, per la produzione di lipasi da *Candida* sp., aumentando la quantità di ossigeno disciolto nel terreno di produzione, come conseguenza dell'incremento della

velocità di agitazione (200, 400 e 500 giri/min), si ha un miglioramento considerevole dell'attività e, in particolare, un anticipo del picco massimo. Questo conferma l'importanza dell'ossigeno nella via metabolica di sintesi della lipasi. Nello stesso lavoro, è stato anche notato che, invece, aumentando l'ossigeno disciolto nel mezzo mediante un aumento del flusso di aria non si hanno miglioramenti significativi né sulla produzione né sulla produttività. Invece, in un esperimento condotto in fermentatore ad agitazione meccanica è stato studiato l'effetto dell'agitazione su una eventuale inattivazione da stress dell'attività lipolitica da *C. cylindracea* (nota anche come *C. rugosa*). Una soluzione di lipasi allo 0,1% è stata posta in agitazione continua a varie velocità di agitazione (300, 450, 600 e 900 giri/min). Ad ogni velocità di agitazione è stata osservata una continua perdita di attività lipolitica nel tempo. Al di sopra di 450 giri/min, c'è un forte aumento della denaturazione dell'enzima con l'aumentare dell'agitazione, ma aggiungendo un agente antischiuma la velocità di denaturazione diminuisce del 93% (Lee e Choo, 1989). Nessun effetto di denaturazione della lipasi prodotta da *C. rugosa* è stato, invece, osservato a diverse velocità di agitazione (250, 500 e 700 giri/min) da Gordillo et al. (1995).

Lipasi da *Candida rugosa*: profilo isoenzimatico

C. rugosa produce più isoenzimi che possono essere codificati da 7-10 geni (Brocca et al., 1995), nominati Lip1, Lip2, Lip3 fino a Lip7. L'eterogeneità delle differenti isoforme sono il risultato dell'espressione di differenti geni e/o di modificazioni post-traslazionali che possono essere modulati dalle condizioni colturali (Lotti et al., 1998). La scelta delle condizioni colturali ed in particolare la composizione del mezzo, gli induttori, il tipo di fermentazione (batch/fed-batch), la velocità di feed, etc., sono importanti per la produzione di lipasi da *C. rugosa* con definite e riproducibili proprietà catalitiche (Dalmau et al., 2000; Ferrer et al., 2001; Dominguez de Maria et al., 2005a). E' stato osservato che *C. rugosa* ha un codice genetico non universale (Kawaguchi et al., 1989) e, come risultato, nessun enzima attivo è stato ottenuto fino ad ora dall'espressione dei suoi geni della lipasi in altri microrganismi ospiti (Gordillo et al., 1998).

Gli studi più interessanti sono quelli tesi a trovare una relazione tra gli induttori e il profilo isoenzimatico ottenuto. Le lipasi commerciali da *C. rugosa* (CRL) sono costituite da una miscela di isoforme, Lip1, Lip2 e Lip3, presenti in differenti proporzioni che dipendono dalla casa fornitrice. Per esempio, la lipasi venduta da Sigma

è costituita da Lip1, Lip2 e Lip3 nelle seguenti percentuali: 73, 8 e 19%. Invece, il campione venduto da Roche contiene gli stessi enzimi in percentuali leggermente differenti, 66, 13 e 21%, rispettivamente (Dominguez de Maria et al., 2005a). Comunque, in tutte le miscele commerciali testate, Lip1 è il maggior componente, mentre Lip2 e Lip3 variano tra lo 0 e il 25%.

Recentemente, studi più approfonditi circa l'influenza dell'induttore sul profilo enzimatico secreto hanno permesso di comprendere meglio la produzione di lipasi da *C. rugosa*. In fermentazioni di tipo batch o di tipo fed-batch a basse velocità di feed, utilizzando acido oleico o olio di oliva è possibile produrre solo una miscela costituita dalle isoforme Lip2 e Lip3 in proporzioni differenti. La secrezione della isoforma Lip1 si ha solo utilizzando come induttore l'1-dodecanolo, in condizioni batch, oppure impiegando l'acido oleico in condizioni di fed-batch ad elevate velocità di feed (Sanchez et al., 1999b; Lopez et al., 2004; Dominguez de Maria et al., 2005a).

1.2 LA PRODUZIONE OLEARIA

L'industria di trasformazione delle olive è un settore particolarmente fiorente nei paesi dell'area mediterranea, tanto che da soli producono circa il 98% del quantitativo mondiale di olio (Vassilev et al., 1997a; Borja et al., 2006). Nella Comunità Europea, l'Italia è, insieme alla Spagna, tra i principali produttori di olio: ogni anno, durante la campagna olearia, si attivano circa 6.000 frantoi che lavorano in media una quantità di 2 milioni di tonnellate di olive con una resa in olio del 20%.

Dalla lavorazione delle olive finalizzata alla produzione di olio, nell'area mediterranea, si ottengono anche 20 milioni di quintali di rifiuti, di cui 2/3 sono costituiti da uno scarto di produzione, le acque di vegetazione (AV), ed 1/3 da un sottoprodotto, la sansa vergine.

Dalla sansa si recupera, mediante estrazione con solventi, l'olio residuo (olio di sansa); le sanse disoleate possono poi essere utilizzate come fertilizzante o combustibile alternativo (Petrucchioli, 1989). Le AV, invece, prodotte in elevati volumi ($3 \times 10^7 \text{ m}^3$ all'anno) (Sayadi & Ellouz, 1995), a causa della loro natura e composizione costituiscono, per i frantoi, un rilevante problema economico.

1.2.1 Il ciclo produttivo del frantoio oleario

Il ciclo di produzione dell'olio extravergine di oliva prevede un primo stadio di preparazione della pasta di olive ed uno successivo di estrazione dell'olio.

Nel primo stadio le olive vengono defogliate e lavate in un'unica macchina e poi sottoposte a frangitura in grosse macine di pietra dura o metallo. Si ottiene così la pasta di olive che viene raccolta in un recipiente in cui, grazie ad una blanda agitazione, si facilita il processo di estrazione dell'olio (coalescenza dell'olio). Questa operazione è detta gramolatura.

L'estrazione dell'olio prevede diversi sistemi di lavorazione, evolutisi a partire da impianti tradizionali. Gli elevati costi di manodopera hanno portato allo sviluppo di tecnologie di estrazione automatica che non necessitano dell'intervento diretto dell'uomo. Tuttavia, esistono ancora piccoli impianti tradizionali discontinui, in quanto molti ritengono che producano olio di migliore qualità.

1.2.2 Sistemi di estrazione dell'olio

L'estrazione dell'olio può essere effettuata attraverso uno dei seguenti sistemi di lavorazione:

Sistema discontinuo o a pressione. E' il processo tradizionale. Si basa sull'utilizzo di grandi presse idrauliche per spremere la pasta di olive. La polpa di olive esausta costituisce la sansa. Il liquido (mosto oleoso), costituito da olio e acque di vegetazione, viene passato alla fase successiva di centrifugazione, che consente la separazione dell'olio dalle acque di vegetazione e dai solidi in sospensione. Con questo processo le AV rappresentano circa il 40% in peso della quantità di olive inviata alla spremitura (Bing et al., 1994).

Sistema continuo o per centrifugazione. E' il sistema più innovativo; si aggiunge acqua tiepida per la diluizione della pasta di olive in modo da facilitare l'estrazione dell'olio durante la centrifugazione che consente la separazione diretta di AV (miste ad un residuo di olio), olio (con un residuo di AV) e sansa. Le miscele di olio e di AV vengono quindi ulteriormente centrifugate per separare le frazioni di acqua ed olio contenute come impurezze. L'aggiunta di acqua provoca la riduzione del livello di antiossidanti naturali nell'olio a discapito, però, della sua qualità. Questo sistema di estrazione centrifugo, denominato *sistema a 3-fasi*, è attualmente il più diffuso in Italia (Demicheli & Bontoux, 1996).

La diffusione di questo sistema ha prodotto una serie di effetti: l'aumento delle dimensioni medie dei frantoi, l'aumento dell'acqua di processo e di conseguenza, l'aumento del quantitativo di AV (Montedoro, 1996).

Sistema per centrifugazione con riciclo delle AV. Questo sistema prevede, durante le fasi di estrazione, il riciclo totale o parziale delle AV al posto dell'acqua di rete (Cioni, 1991; Amirante et al., 1992). In questo modo si ottiene un miglioramento della qualità dell'olio, poiché si aumenta in esso il tenore di polifenoli totali di circa il 30% ed una riduzione del volume delle acque di vegetazione del 35-40% (Amirante et al., 1992).

Sistema di estrazione dell'olio per centrifugazione a due fasi. Da alcuni anni, si sono diffusi impianti che consentono la separazione della fase oleosa dalla pasta di olive gramolata, senza l'aggiunta di acqua (Alba Mendoza, 1992; Uceda Ojeda et al., 1993;

Di Giovacchino, 1994 ; Borja et al., 2006); così facendo, dalla pasta di olive, si ottengono solamente due fasi: l'olio e la sansa vergine umida. Tale innovazione determina importanti risultati, come la riduzione, fino all'annullamento, della quantità di AV prodotta e permette di conseguire quasi gli stessi rendimenti in olio ottenuti con la centrifugazione convenzionale a tre fasi (Di Giovacchino, 1994).

Tale processo, definito da alcuni "ecologico", sembra in apparenza eliminare il problema legato allo smaltimento delle AV, ma ne determina, tuttavia, un altro: la produzione delle sanse umide.

Questo sottoprodotto infatti, a causa dell'elevato tasso di umidità (50-60%), viene rifiutato dai sansifici per gli alti costi di essiccazione connessi al ciclo di lavorazione per il recupero dell'olio residuo (Amirante, 1993; Di Giovacchino et al., 1994). Inoltre, l'elevato tenore di umidità rende questo residuo solido non palabile creando problemi di smaltimento e facilita l'insorgenza di fenomeni fermentativi che, instaurandosi in poche ore, impongono brevi tempi di trasporto (Montedoro, 1996). Attualmente in Spagna quasi la totalità degli impianti sono a due fasi e le sanse umide vengono essiccate e l'olio residuo viene recuperato; tuttavia, sono enormi i problemi connessi allo smaltimento di tale residuo secco per la sua elevata fitotossicità (Borja et al., 2006).

Queste tipo di problemi ed i costi elevati per l'installazione dei nuovi impianti di estrazione hanno ridotto la diffusione di questo tipo di processo che attualmente è diffuso oltre che in Spagna in pochi altri Paesi, tra cui la Croazia (Borja et al., 2006).

Il sistema a 3-fasi è attualmente il più diffuso e di conseguenza vengono prodotti notevoli volumi di AV creando un problema ambientale tuttora senza una soluzione definitiva (Demicheli & Bontoux, 1996).

Tabella 1.1 Produzioni specifiche medie di olio, sansa e AV ottenute attraverso i tre processi di estrazione ed espresse in Kg/q di drupe lavorate (modificato da Bing et al., 1994).

PROCESSO	OLIO	SANSA	AV
Pressatura continua	18-23	35-40	42
Centrifugazione a 3 fasi	20-25	35-40	80-120
Centrifugazione a 2 fasi	18-23	77-82	/

1.2.3 Sottoprodotti dell'estrazione dell'olio

Come detto in precedenza, dal processo estrattivo si ottengono due sottoprodotti, la sansa vergine e le acque reflue. Ciascuno dei due è oggetto di studio da molti anni ma

sembra che ancora oggi non sia stata trovata una facile soluzione per ovviare ai problemi connessi alla loro produzione.

La sansa vergine rientra nella classe degli ammendanti organici naturali grazie alle sue caratteristiche: non contiene metalli pesanti, inquinanti tossici od organismi patogeni; è costituita da sostanza organica di origine vegetale non fermentata che risulta stabile. La sansa viene sottoposta ad un processo di essiccazione e di estrazione con solvente della quantità di olio residuo. In questo modo si ottengono due prodotti:

- a) olio di sansa;
- b) sanse disoleate.

Le sanse disoleate possono essere bruciate o divise nei propri costituenti, i noccioli utili per alimentare i bruciatori e le buccette che potranno essere vendute come additivi ai mangimi per uso zootecnico.

Alcuni importanti settori di possibile utilizzazione della sansa esausta sono: produzione di energia, agricoltura, mangimistica, fabbricazione di laterizi, ebanisteria, estrazione alcoli triterpenici (Demicheli & Bontoux, 1996).

Le acque di vegetazione sono considerate tra i materiali di scarto di origine agroalimentare a più elevato tasso inquinante. Tale proprietà inquinante e fitotossica è connessa al considerevole carico organico, all'elevata acidità, al potere antimicrobico degli acidi grassi liberi, dei fenoli semplici e del pigmento catecolmelaninico, che riduce considerevolmente la capacità metabolica della flora batterica (Petrucchioli et al., 1990).

I problemi legati alla produzione delle AV sono causati non solo dalla loro particolare composizione chimica ma soprattutto dall'enorme massa globale di refluo prodotta ogni anno (Sayadi & Ellouz, 1995).

A questo si aggiungono altre difficoltà tecniche quali le dimensioni, la distribuzione e l'elevato numero dei frantoi e l'eterogeneità del refluo per composizione e carico inquinante, dovuto al sistema di estrazione dell'olio impiegato.

1.2.4 Composizione delle acque di vegetazione

Le AV presentano una colorazione bruno scura tendente al nero ed un odore caratteristico che ricorda il frutto dal quale derivano; contengono una notevole quantità di sostanze in sospensione rappresentata da frammenti di polpa di olive, sostanze mucillaginose, pectina e piccole quantità di olio in emulsione.

La composizione chimica delle AV, notevolmente complessa, presenta un'elevata variabilità dipendente da molti fattori: condizioni climatiche, geografiche e pedologiche

del terreno in cui si trova l'oliveto, varietà delle olive, impiego e tipo di fertilizzanti, grado di maturazione e conservazione delle drupe, età della pianta e, come già ricordato, dal sistema di estrazione dell'olio (Montedoro et al., 1986). La composizione delle AV, inoltre, può essere modificata dalla commistione con acque di lavaggio dell'impianto oleario che, se da un verso diluiscono il refluo, dall'altro possono contenere saponi e detergenti (Amat di San Filippo et al., 1986).

Particolare importanza ha, infine, il tempo di permanenza nell'inferno rappresentato da vasche di raccolta delle AV, dove hanno luogo numerosi processi fermentativi.

La composizione media delle AV è considerata la seguente: 83,4% di acqua, 14,8% di composti organici e 1,8% di composti minerali (Amat di San Filippo et al., 1986).

Fra i componenti organici presenti nelle AV prevalgono quantitativamente i carboidrati. Sono presenti sia zuccheri semplici come glucosio, fruttosio (entrambi direttamente fermentescibili), raffinosio, mannosio e xilosio, sia polisaccaridi come la cellulosa e le pectine derivate dalla polpa di oliva e costituenti i solidi totali in sospensione.

Si è inoltre rilevata la presenza di acidi organici (acetico, tartarico, lattico e malico), i quali influiscono sulle AV rendendo il pH leggermente acido (4,9-6,5) (Montedoro et al., 1986).

La presenza di sostanze azotate tra le quali numerosi aminoacidi, in particolar modo acido glutammico e prolina, determinano nelle AV un notevole potere tamponante verso acidi e basi.

Nelle AV sono presenti anche composti mono e polifenolici, sostanze in grado di inibire i processi metabolici dei microrganismi e responsabili della tossicità del refluo (Capasso et al., 1997).

I polifenoli liberi sono composti organici non volatili e solubili in acqua. Si formano soprattutto dall'idrolisi enzimatica di glucosidi ed esteri della polpa delle olive. Si solubilizzano durante la fase di estrazione dell'olio in quantità molto minore rispetto alle AV. Tra i polifenoli prevalgono fenoli semplici, sostanze tanniche (come i flavonoidi e le catechine e nel caso di olive scure anche antocianosidi e antocianine) (Sanjust et al., 1994; Raglione et al., 1997) e polimeri originati dall'accoppiamento ossidativo dei fenoli semplici (pigmento catecolmelaninico). In particolare, le componenti fenoliche monoacicliche più rappresentative delle AV sono costituite da catecolo, 4-metilcatecolo, tirosolo, idrossitirosolo, ac. caffeico, ac. *p*-cumarico, ac. vanillico, ac. protocatechico, ac. gallico, ac. sirigico, ac. 4-idrossibenzoico, ac. 4-idrossifenilacetico, ac. *p*-idrossifenilpropionico (Capasso et al., 1997).

Nel refluo sono contenute anche piccole quantità di cere e resine, oltre a vitamine e spesso ormoni e tracce di pesticidi.

Riguardo alla composizione minerale, gli elementi prevalenti sono sodio, potassio, calcio, cloro, magnesio e fosforo (Montedoro et al., 1986; Ranalli, 1989; Paredes et al., 1999). Ciò favorisce un possibile utilizzo delle AV in agricoltura (Levi-Minzi et al., 1991; Andrich et al., 1992), rispettando i limiti quantitativi previsti dalla normativa.

La frazione lipidica nelle AV è presente in misura estremamente variabile ed inversamente proporzionale al grado di efficienza dell'estrattore centrifugo (decanter) che attua la separazione della fase acquosa da quella oleosa nei processi a tre fasi.

In ogni caso la componente lipidica più rappresentativa è costituita da triacilgliceroli di acidi grassi insaturi a catena lunga (trioleina, trilinoleina) o gliceridi parziali.

In misura minore sono presenti anche fosfolipidi e alcuni composti appartenenti alla classe degli insaponificabili, tra cui sitosterolo, citrostadienolo e derivati terpenoidici (squalene e carotenoidi). In generale, non sono presenti acidi grassi liberi.

Un aspetto in qualche modo connesso alla composizione e alle caratteristiche delle AV è la carica microbica, che può dipendere dalle condizioni e dalle modalità di raccolta delle olive (Tabella 1.2).

Nel refluo oleario, i microrganismi si rinvergono e si sviluppano, anche se la loro attività risulta fortemente inibita rivestendo scarso significato dal punto di vista pratico per la degradazione naturale del carico organico (Martinez et al., 1986).

La popolazione microbica è rappresentata in prevalenza da specie blastomicetiche (lieviti) ma sono presenti anche batteri, attinomiceti e muffe (Luparini, 1939; Ciferri et al., 1948).

Esiste una grande variabilità nella composizione delle AV: in Tabella 1.3 sono riportati i valori medi delle varie sostanze presenti nel refluo ottenuto dal processo di estrazione per pressione e per centrifugazione.

1.2.5 Eco-tossicità delle acque di vegetazione

La letteratura scientifica evidenzia opinioni contrastanti per quanto riguarda la tossicità delle AV.

Alcune ricerche hanno dimostrato una generale tossicità nei confronti della microflora e della microfauna. Le AV, infatti, esercitano generalmente un'azione inibitrice verso i microrganismi deprimendone e rallentandone l'attività e provocando di conseguenza degli squilibri negli ecosistemi naturali (Camurati et al., 1984). Di contro, altri autori

ritengono che le AV siano un ottimo substrato per lo sviluppo della microflora, grazie alla presenza di elementi nutritivi minerali quali azoto, fosforo e magnesio e di sostanza organica e considerano le opportunità offerte dallo spandimento del refluo per migliorare le proprietà chimico-fisiche del suolo (Amirante et al., 2001). Da uno studio teso a valutare gli effetti sull'attività microbica nel suolo in seguito allo spandimento di AV a due livelli di applicazione (36 e 72 m³ ha⁻¹) è emerso che l'attività è solo leggermente influenzata dall'applicazione delle AV, in termini di respirazione e di attività idrolitica. L'impatto sulla microflora del suolo dovrebbe essere considerato sotto due aspetti: il temporaneo arricchimento del suolo con fonti di carbonio facilmente utilizzabili e l'aggiunta di un refluo contenente composti inibenti per alcuni microrganismi. I risultati di questi studi mostrano che le AV, ai livelli a cui vengono applicate, stimolano l'attività microbica del suolo e in generale non sono dannose per la microflora del suolo. Comunque la possibile inibizione per alcuni funghi presenti nel terreno deve essere ulteriormente investigata (Saadi et al., 2007). L'aumento di attività e di biomassa microbica, in seguito allo spandimento di AV, è stata osservata anche in altri studi (Paredes et al., 1986; Alianiello et al., 1998; Gamba et al., 2005). Tuttavia, non sono esclusi possibili cambiamenti nella struttura della comunità microbica del suolo trattato. Paredes et al. (1986) hanno trovato una sostanziale diminuzione nel numero di *Bacillus* sp.; Tardioli et al. (1997) hanno notato cambiamenti nella composizione fungina del suolo trattato, in particolare una diminuzione in *Scopulariopsis brevicaulis* e un aumento di *P. cyclopium*, specie molto abbondante nelle AV. Infine Kotsou et al. (2004) hanno dimostrato che l'aggiunta di AV risulta in uno spostamento verso specie batteriche copiotrofiche. Questi cambiamenti sono attesi anche in seguito all'aggiunta di altri scarti organici, come per esempio i composts, ma sono anche reversibili (Stenstrom et al., 2001).

Nelle stesse AV si rinvenivano e si sviluppano microrganismi anche se la loro attività risulta talora inibita. Alcuni autori, infatti, (Martinez et al., 1986) hanno rilevato valori di carica microbica superiore a 10⁵ microrganismi/ml, con una prevalenza di lieviti rispetto a batteri che, però, prendono il sopravvento a seguito di un prolungato periodo di stoccaggio in vasche. I microrganismi patogeni, invece, sono generalmente assenti e quindi non si creano implicazioni igienico-sanitarie.

Il potere antimicrobico delle AV dipende soprattutto dall'elevata concentrazione di mono e polifenoli che può variare tra 1,5 e 8,0 g/l in funzione del processo utilizzato nell'estrazione dell'olio (Servili e Montedoro, 1989).

I polifenoli probabilmente agiscono sui microrganismi denaturando le proteine cellulari e danneggiando le membrane, mentre i tannini inibiscono le attività enzimatiche (Montedoro, 1958; Montedoro, 1973). Alcuni fenoli, inoltre, riducono notevolmente la tensione superficiale esaltando l'azione antimicrobica (Ranalli et al., 1995).

Da ricerche effettuate su effluenti industriali e agro-industriali è stata rilevata la presenza di alcuni composti fenolici ritenuti altamente tossici e cancerogeni per l'uomo (Klibanov et al., 1980). La rimozione dei fenoli è quindi un punto chiave per l'utilizzo delle AV. In particolare, riveste un notevole interesse applicativo e ambientale il trattamento microbiologico dei reflui tramite microrganismi che possiedono enzimi in grado di ossidare i fenoli (Klibanov et al., 1980; Lee et al., 1996). Per esempio, un fungo white-rot, come *Lentinula edodes*, immobilizzato su poliuretano si è mostrato in grado di biodegradare le AV. Dopo tre cicli di trattamento il carico inquinante del refluo è notevolmente diminuito, in particolare è stato notato un abbattimento anche dell'88% del contenuto di fenoli totali e una forte decolorazione del mezzo (D'Annibale et al., 1998).

Oltre ai polifenoli anche altre sostanze sembrano mostrare azione inibitrice nei confronti di microrganismi tellurici e delle colture agrarie. La frazione lipidica può causare diminuzione della fertilità agronomica del terreno, sia a causa di una certa impermeabilizzazione dovuta alla formazione di uno strato superficiale di residui oleosi che provoca una minore areazione di tutto lo strato attivo interessato a fenomeni aerobici, sia a causa della tossicità che alcuni composti manifestano nei riguardi della flora batterica.

Tabella 1.2 Numero di microrganismi (range) presenti nelle AV ($N \cdot 10^5/\text{ml}$) (Florenzano, 1986).

Stato delle olive	Batteri	Attinomiceti	Funghi	Totale
Olive sane raccolte a mano	2,70-4,08	0,76-2,09	10,05-18,02	13,51-24,19
Olive raccattate ed alterate	54,25-68,52	1,80-2,20	87,50-93,00	143,55-163,72

Tabella 1.3 Composizione delle AV provenienti da oleifici operanti con sistemi a pressione e a centrifugazione (a 3-fasi) (Padilla et al., 1990)

**Sono riportati i valori medi*

PARAMETRI	PRESSIONE	CENTRIFUGAZIONE
Acqua (%)		83-96
Sostanza organica (%)		3-16
Zuccheri totali (g/l)	20-80	5-26
Polialcoli (mannitolo) (g/l)	10-15	3-5
Sostanze azotate (g/l)	5-20	4-17
Grassi (g/l)	0,3-10	3-23
Acidi organici (g/l)	5-10	2-4
Polifenoli (g/l)	10-24	3-8
O-difenoli (g/l)	0,9-13,3	2-6
Idrossitirosolo (mg/l)	71-937	43-426
Composti minerali (%)		0,4-7
Fosforo totale (mg/l)	485-1500	185-400
Sodio (mg/l)	110	36
Potassio (mg/l)	2470	950
Calcio (mg/l)	162	69
Magnesio (mg/l)	194	90
Ferro (mg/l)	32,9	14,9
Rame (mg/l)	3,12	1,59
Zinco (mg/l)	3,57	2,06
Manganese (mg/l)	5,32	1,56
Nichel (mg/l)	0,78	0,56
Cobalto (mg/l)	0,43	0,18
Piombo (mg/l)	1,05	0,42

Anche gli acidi grassi presenti nelle acque di vegetazione esplicano potere antimicrobico, che va ad aggiungersi a quello esercitato dai fenoli (Stevenson et al., 1966; Wang et al., 1969).

Le acque di vegetazione sono un refluo acido e lo spandimento causa un cambiamento nel pH del suolo. La riduzione del pH può influenzare la capacità del suolo di immobilizzare e rilasciare Ca, Mg, K e metalli pesanti. Inoltre, il trattamento del suolo con AV ne fa aumentare la conduttività elettrica e la salinizzazione. Tutti questi fenomeni incidono sulla fertilità del terreno. Un altro fenomeno da tenere in considerazione è che in seguito allo spandimento si ha nel suolo un arricchimento in Na solubile che può migrare verso orizzonti più profondi e potrebbe rappresentare un rischio di contaminazione per gli acquiferi (Zenjari&Nejmeddine, 2001; Piotrowska et al., 2006). Comunque, un fenomeno che è stato notato da molti autori è che gli effetti dello spargimento delle AV sul suolo sono a breve termine: se le dosi di refluo applicate non sono troppo elevate, infatti, si ha un completo o quasi totale recupero delle caratteristiche chimiche e biochimiche peculiari del suolo.

In conclusione, l'impatto delle AV è il risultato di opposti effetti che dipendono dalle quantità relative di composti organici e inorganici, tossici e non, presenti. In definitiva, è necessario un utilizzo oculato e controllato di questo refluo per garantire la sicurezza per l'uomo e la salvaguardia dell'ambiente. Dal punto di vista legislativo, sebbene per natura e composizione gli scarichi dei frantoi oleari non debbano essere inclusi tra i rifiuti tossici e nocivi (legge 24.3.1987 n.119), non possono, comunque, essere considerati reflui comuni perchè presentano un certo grado di tossicità.

1.2.6 Aspetti tecnico-economici dello smaltimento delle acque di vegetazione

Gli ingenti volumi di AV prodotti ogni anno creano nelle regioni mediterranee che operano nel settore olivicolo-oleario, problemi economici ed ambientali di difficile soluzione.

La mole dei prodotti di scarto è un aspetto tecnico fondamentale da considerare nell'analisi gestionale dell'industria olearia. Gli impianti di estrazione per centrifugazione producono una quantità di refluo pari al peso delle olive lavorate, mentre in un impianto a presse il refluo prodotto è circa il 70% ma con un carico inquinante maggiore, poiché meno diluito.

Un altro aspetto tecnico di fondamentale importanza riguarda la stagionalità della produzione legata alla durata della campagna olearia, circa 100-120 giorni nei mesi da novembre a febbraio.

Nell'analisi economico-gestionale si devono analizzare le caratteristiche e la tipologia dei frantoi al fine di selezionare l'impianto di trattamento delle acque più adatto. In particolare, gli impianti presentano problematiche di collocazione poiché i frantoi si trovano in aree rurali, spesso collinari, prive di collettori fognari e con problemi di viabilità.

Inoltre, si deve valutare anche la potenzialità media dei frantoi che è compresa tra 5 e 25 tonnellate di olive al giorno a cui corrisponde una produzione di reflui di circa 3-10 m³/giorno per gli impianti a presse e di 5-25 m³/giorno per quelli continui. Queste cifre devono essere confrontate con i costi relativi alla realizzazione di un impianto di trasformazione delle olive e con l'eventuale investimento per l'impianto di depurazione. La redditività degli impianti deve essere valutata anche rispetto ai costi di gestione. Infatti, la conduzione di un frantoio necessita sia di manodopera specializzata nella lavorazione delle olive che di operai senza particolare preparazione, mentre spesso non dispone di una direzione tecnica qualificata in grado di gestire impianti complessi come i depuratori di tipo biologico.

Attualmente, non esiste ancora un'impiantistica idonea a risolvere il problema dello smaltimento delle AV poiché la realtà tecnica ed economica moderna si è dovuta scontrare con una mentalità radicata nell'antica tradizione della molitura che stenta a considerare "inquinanti" i reflui dei frantoi oleari. A ciò si aggiunge il fatto che le associazioni del settore olivicolo-oleario non si sono operate come parte attiva nel recepimento della legislazione e nella formazione professionale degli operatori, nonostante gli aiuti comunitari.

1.2.7 Quadro normativo

Lo smaltimento delle acque reflue, a causa del loro carico potenzialmente inquinante, è stato ed è tuttora oggetto di leggi e normative in continua evoluzione. Fino al 1996 la gestione delle acque reflue di frantoio era regolata dalla legge Merli (n.319 del 10.5.1976) che prevedeva la depurazione di questi reflui poiché non conformi ai valori dei parametri previsti. Le AV, avendo un carico organico troppo elevato, non

rientravano nei limiti di accettabilità degli scarichi permessi nelle acque sotterranee e nelle fognature e quindi venivano classificate tra i reflui tossici.

L'applicazione rigorosa della legge avrebbe però di fatto comportato la chiusura della maggior parte degli oleifici italiani che a causa delle loro piccole dimensioni non sarebbe stata in grado di realizzare le economie di scala necessarie per sostenere i costi di un impianto di depurazione (Amirante et al., 1989).

Con la legge n. 119 del 24.3.1987 iniziarono una serie di deroghe alla legge Merli. La normativa consentiva in via provvisoria, lo spargimento dei reflui, previo abbattimento del 50% del carico inquinante. Questo regime transitorio è stato prorogato più volte fino all'approvazione della legge n. 574 del 11.11.1996, con la quale viene autorizzata e regolata l'utilizzazione del refluo. La normativa consentiva lo spandimento sul terreno ad uso agricolo delle AV tal quali e delle sanse umide per un quantitativo massimo di $80 \text{ m}^3/\text{ha}$ di superficie per un anno, nel caso di acque provenienti da impianti di estrazione a ciclo tradizionale. Lo spandimento era altresì limitato a terreni con falde site ad una profondità superiore a 10 m. Veniva richiesta inoltre una comunicazione, da parte dell'interessato allo spandimento, al sindaco del comune in cui erano ubicati i terreni, corredata da una relazione tecnica che attestasse l'idoneità idrogeologica ed agronomica dei terreni suddetti e che descrivesse le metodologie ed i tempi dello smaltimento in campo del refluo oleario (Art.3).

Il decreto legislativo n.22 del 15.2.1997 (decreto Ronchi) inserisce le AV fra i rifiuti non pericolosi sottoposti alle procedure semplificate di recupero e destinate alla produzione di fertilizzanti.

Un ulteriore e decisivo passo verso una gestione più organica delle risorse idriche è il Decreto Legislativo n. 152 del 11.5.1999, detto "testo unico", modificato dal Decreto Legislativo n. 258 del 18.8.2000, "Acque bis" sugli scarichi e la tutela delle acque. Il decreto recepisce le direttive CEE 91/271 e 91/676 ed incardina in un unico sistema normativo tutta la legislazione in materia, in modo profondamente rinnovato. Conferma di tale evoluzione è la completa abrogazione della legge n. 319/76 e tutta la successiva normativa satellite. Il "testo unico", basandosi sul Decreto Ronchi, inserisce le AV tra i rifiuti non pericolosi, e demanda alle Regioni le decisioni riguardo limiti di accettabilità, utilizzazione agronomica e modalità di spandimento delle AV. Attualmente, però, non tutte le Regioni si sono ancora pronunciate in materia di utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e degli scarichi dei frantoi oleari.

1.2.8 Tecnologie adottabili per lo smaltimento delle acque reflue di frantoi

Nel settore olivicolo, si è determinata una situazione di stasi nella diffusione degli impianti di depurazione. Tale situazione è stata provocata dalle continue proroghe alla definitiva applicazione delle normative di legge 319/76 (legge Merli), dagli elevati costi di acquisto e di gestione degli impianti di depurazione. Attualmente le soluzioni adottabili per lo smaltimento delle acque reflue dei frantoi oleari comprendono: lo spandimento su terreno agrario (fertirrigazione); trattamenti fisici quali, l'incenerimento, l'essiccazione, la concentrazione per evaporazione, l'ultrafiltrazione ed osmosi inversa e la separazione criogenica; trattamenti chimici con calce e con sali ferrici e/o persolfonato di sodio; trattamenti ossidativi; trattamenti elettrochimici; trattamenti biologici quali, digestione anaerobia, ossidazione biologica a fanghi attivi, lagunaggio e fitodepurazione (Hamdi, 1995; Vitolo et al., 1999; Javier Benitez et al, 2001; Marques, 2001; Turano et al., 2002; Potoglou et al., 2003; Khoufi et al., 2006; Belaid et al., 2006; Panizza & Cerisola, 2006; Paraskeva & Diamadopoulos, 2006; Roig et al., 2006). Molte soluzioni sono state proposte per il trattamento delle AV ma molti fattori devono essere presi in considerazione per selezionare il miglior metodo, quali quantità totale di refluo, investimento richiesto, leggi locali, etc. Sebbene il problema potrebbe essere più o meno risolto dal punto di vista tecnologico, è ancora lontana una reale soluzione principalmente a causa di ragioni pratiche/economiche. Altri promettenti metodi si stanno sviluppando, che mirano al riutilizzo e alla valorizzazione delle AV attraverso l'ottenimento di prodotti ad elevato valore aggiunto come carboni attivi da reflui agroindustriali e il recupero di composti organici quali oli, antiossidanti o enzimi.

1.2.9 Riutilizzo e valorizzazione dei reflui oleari

Negli ultimi anni si stanno cercando soluzioni alternative agli impianti di depurazione, i quali presentano l'inconveniente di costi di gestione non facilmente sopportabili dai frantoi oleari. Le sperimentazioni condotte nell'ambito dello smaltimento delle AV hanno portato alla consapevolezza che la depurazione di questo refluo richieda lo sviluppo di impianti complessi, basati sull'integrazione di diverse tecnologie di trattamenti. Tale necessità è imposta dall'elevato carico organico del refluo (35.000-150.000 mg/l di COD) e dalla presenza di composti ad attività biostatica e/o biocidi, che riducono fortemente le prestazioni degli impianti biologici. Di conseguenza, un impianto di depurazione deve prevedere uno o più sistemi di trattamento (chimico,

fisico o chimico-fisico) che eliminino le sostanze non degradabili biologicamente ed, in seguito, un trattamento biologico finale (Amirante, 1993).

E' in questo contesto che si è cercato di procedere al tentativo di abbattere il potere inquinante di questo refluo cercando di ottenere al contempo, prodotti di potenziale interesse commerciale nei vari settori delle differenti industrie.

Sono state individuate due linee di intervento:

- recupero e valorizzazione di costituenti, originariamente presenti nelle acque, ad elevato valore aggiunto quali composti aromatici ad attività antiossidante, come ad esempio l'idrossitirosolo o molecole a struttura terpenica, come lo squalene;
- utilizzazione delle acque di vegetazione, dopo adatti trattamenti ed opportune eventuali integrazioni, quale substrato per lo sviluppo di microrganismi in grado di garantire, oltre ad un più o meno spinto abbassamento del carico organico, l'ottenimento di prodotti di elevato interesse tecnologico quali biomasse, enzimi, ecc. (approccio fermentativo).

Qui di seguito sono riportati i prodotti ottenuti dal trattamento delle AV.

Pesticidi naturali: l'estrazione di prodotti dalle AV può essere utilizzata nella gestione della lotta integrata per la protezione di piante di olive, ed eventualmente altre come pomodori, peperoni etc. Considerato che i pesticidi possono essere estratti direttamente dal frazionamento delle AV, tale processo è in via di diffusione su larga scala attraverso metodi di ultrafiltrazione. Alcuni ricercatori hanno studiato un composto non fenolico ad attività fungistatica (De Micheli & Bontoux, 1996).

Cosmetici: è noto che lo squalene, usato nell'industria cosmetica come agente idratante ed emolliente, è contenuto nella frazione non saponificabile dell'olio d'oliva. Recenti studi hanno sperimentato la sua estraibilità per distillazione dalle AV. Tale procedimento potrebbe costituire una valida alternativa all'estrazione, attualmente in uso, dello squalene dall'olio del fegato dei pesci (Gunawan et al., 2007; Grigoriadu et al., 2007; Vazquez et al., 2007).

Biofarmaci: è noto che un gran numero di composti trovati nelle acque di vegetazione siano inibitori per i microrganismi (Gonzalez et al., 1990). Sebbene l'utilizzo di tali composti antimicrobici (antivirali e antibiotici) in applicazioni farmacologiche non sia ancora stato sfruttato, tale opportunità deve essere certamente presa in considerazione.

In particolare, le tetracicline potrebbero essere tra i componenti dei reflui oleari. I polifenoli, rappresentano una classe di composti che potrebbero avere interesse nelle applicazioni farmaceutiche. In particolare essi sono buoni composti antifungini ed è anche stato suggerito che potrebbero essere usati per il controllo di un gran numero di malattie di frutta e vegetali.

Recentemente, i polifenoli vegetali sono stati considerati come potenziali composti antivirali (Buciumeanu et al., 1994). Negli ultimi anni si stanno studiando possibili applicazioni di alcuni componenti delle AV come antitumorali.

Composti antiossidanti: nelle AV sono presenti diversi composti come antiossidanti e fenoli che potrebbero essere impiegati nell'industria farmaceutica, cosmetica e alimentare (Fernandez-Bolanos et al., 2002; Boucid et al., 2005). I principali antiossidanti trovati nella polpa delle olive sono tirosolo, idrossitirosolo, oluropeina e acido caffeico (Obied et al., 2005). Briante et al. (2004) hanno proposto un bioreattore per la produzione di antiossidanti altamente purificati, che possono essere convertiti in composti farmacologicamente attivi. Inoltre, Turano et al. (2002) hanno proposto un sistema combinato di centrifugazione e ultrafiltrazione che permette la riduzione di contaminanti e la separazione selettiva di prodotti utili (lipidi, zuccheri e polifenoli).

Alcune ricerche stanno valutando la possibilità di estrarre i polifenoli dalle acque di vegetazione, analizzando il potere antiossidante degli estratti ottenuti, con diversi solventi. Si sta inoltre valutando l'effetto protettivo all'ossidazione dell'olio esercitato da alcuni costituenti fenolici ritrovati nei suddetti estratti, come ad esempio il beta-(3,4 diidrossi-fenil) etanolo (Saladino et al., 2002; Fki et al., 2005).

Fertilizzanti fosfatici: alcuni studi hanno dimostrato la capacità dei microrganismi fosforo solubilizzanti di produrre acidi organici in grado di dissolvere direttamente la roccia fosfatica e di chelare ioni calcio, liberando fosfati in soluzione (Kucey et al., 1989; Vassilev et al., 1997b). Si tratta di un'attraente prospettiva e riguarda la trasformazione delle AV in fertilizzanti fosfatici. Infatti utilizzando risorse naturali a basso costo, quali rocce fosfatiche e microrganismi fosforo solubilizzanti in grado di crescere sulle AV, è possibile arricchire in fosforo il refluo (Vassilev et al., 1998). Nei laboratori di Microbiologia Applicata del Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica dell'Università degli Studi della Tuscia è stato studiato il trattamento dei reflui di frantoio oleari con *Aspergillus niger*, noto produttore di acido citrico, ottenendo la

solubilizzazione delle rocce fosfatiche e l'arricchimento del refluo in fosforo solubile (Vassilev et al., 1997 a; Cereti et al., 2004).

Coltivazione di funghi eduli: le acque di vegetazione possono essere utilizzate anche per la coltivazione dei funghi eduli, con particolare riferimento a quelli del genere *Pleurotus*. Si è tentata la coltivazione di quattro specie di *Pleurotus*. I risultati ottenuti da questa sperimentazione hanno evidenziato la capacità del genere *Pleurotus* di metabolizzare le sostanze fenoliche contenute nelle AV e hanno messo in luce la possibilità di ottenere su questo substrato un prodotto valido dal punto di vista qualitativo (Ballero et al., 1990). In uno studio più recente è stato osservato che possono essere utilizzate concentrazioni del 25-50% di AV per la preparazione del substrato per la crescita di due specie di *Pleurotus* (*P. sajor-cajù* e *P. cornucopiae*) (Kalmis & Sargin, 2004).

Produzione di bioenergia: è attualmente diffuso l'utilizzo dei residui delle olive, come carburante in combustioni singole o combinate per produrre energia e calore (Cliffe & Patumsawad, 2001; Caputo et al., 2003).

La fermentazione anaerobica (metanogenesi) produce una quantità di biogas non irrilevante che può essere recuperato ed utilizzato come una risorsa alternativa di energia. I responsabili della produzione di metano sono batteri anaerobi metanogeni (Martin et al., 1991). La maggiore limitazione nella digestione anaerobia delle AV è l'inibizione dei batteri metanogeni da parte di composti fenolici, acidi organici e polifenoli. Opportuni pretrattamenti in grado di modificare o rimuovere questi inibitori naturali, potrebbero migliorare il processo di metanogenesi delle AV (Hamdi, 1996). Dalle acque di vegetazione è stata valutata anche la produzione di altri composti bioenergetici quali etanolo e butanolo (Bambalov et al., 1989 a,b).

Altri ricercatori spagnoli stanno studiando possibili applicazioni dei reflui oleari per la produzione di biodiesel (De Micheli & Bontoux, 1996).

Produzione di biosurfactanti: molti microrganismi sono in grado di sintetizzare differenti tipi di surfactanti quando crescono su diverse fonti di carbonio (Zajic et al., 1984; Parkinson, 1985). Questi surfactanti microbici sono interessanti per la loro natura biodegradabile e l'efficacia a valori estremi di temperatura, pH e salinità (Kretschmer et al., 1982; Kosaric et al., 1987).

Produzione di Compost: il compost si ottiene dalla degradazione aerobia ed anaerobia della sostanza organica presente nei rifiuti agricoli, forestali o urbani. Le AV possono essere addizionate alla sostanza organica in fase di compostaggio per favorire la crescita dei microrganismi (Mari et al., 2003). Lo scopo è quello di ottenere materiale ad alto potere fertilizzante che, se opportunamente addizionato con altri sottoprodotti o scarti agricoli, agro-industriali e forestali, può costituire un ottimo concime organico dalle caratteristiche simili a quello proveniente dai rifiuti organici, ma più sicuro di quest'ultimo in quanto privo di organismi patogeni (Amirante, 1993).

Produzione di esopolisaccaridi e bioplastiche: i reflui oleari sono stati anche utilizzati come substrato per la produzione di xantano, un polisaccaride extracellulare prodotto dal ceppo *Xanthomonas campestris* NRRL B1459-S4LII. Le AV sono state proposte come substrato a basso costo per la produzione di xantano con conseguenti benefici ambientali connessi a questo utilizzo (Lopez et al., 1997, 2001). Un ceppo fungino di *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82, cresciuto su diverse tipologie di AV non diluite, è stato in grado di produrre β -glucano; è stato, inoltre, descritto un abbattimento notevole dei fenoli totali e del COD nel refluo finale (Crognale et al., 2006). Anche altri biopolimeri sono stati prodotti utilizzando le acque di vegetazione come substrato di crescita: pullulano da *Aureobasidium pullulans* (Ramos-Cormenzana et al., 1995) e poli-idrossialcanoati da *Azotobacter chroococcum* H23 (Gonzalez-Lopez et al., 1995). Alcuni studi recenti sembrano indicare che le acque di vegetazione potrebbero essere utilizzate come substrato economico per la produzione di PHB (poli-idrossi-beta-butilirato), così da rendere economicamente più competitiva la produzione di bioplastiche (Dionisi et al., 2005).

Produzione di carboni attivi: le AV possono essere utilizzate come materiale grezzo per la produzione di carboni attivi, con metodi di attivazione sia chimici che fisici (Morena-Castilla et al., 2001).

Produzione di enzimi: altra prospettiva è quella di utilizzare il refluo come substrato di crescita per i microrganismi, capaci di tollerare la sua tossicità, al fine di produrre sostanze ad elevato valore aggiunto, come per esempio enzimi. Le AV contengono, infatti, varie componenti che possono rappresentare dei potenziali induttori per la

biosintesi microbica di enzimi (Crognale et al., 2006). Di seguito si riportano alcuni esempi.

Pectinasi. In alcuni lavori sono state utilizzate le AV come terreno di crescita in fermentazioni indirizzate alla produzione di enzimi pectolitici da parte del lievito *Cryptococcus albidus* var. *albidus* IMAT 4735 (Petrucchioli et al., 1987; Crognale et al., 2006). Nonostante l'elevato tasso inquinante e la forte attività biostatica di questo refluo, questo ceppo microbico era in grado di crescervi, liberare nel mezzo discreti livelli di attività pectolitica e ridurre il BOD₅ (Petrucchioli et al., 1987). Prove di valutazione tecnologica del grezzo enzimatico così ottenuto nell'estrazione meccanica dell'olio d'oliva hanno evidenziato sia cospicui incrementi di resa in olio che miglioramento delle qualità organolettiche del prodotto finito (Petrucchioli et al., 1988; Montedoro et al., 1993). Queste ricerche hanno rappresentato la base per l'ottenimento di un finanziamento CEE, finalizzato alla realizzazione di un impianto pilota dimostrativo-sperimentale per il disinquinamento delle acque di vegetazione. La sperimentazione condotta durante tre campagne olearie ha dimostrato la fattibilità tecnica del processo anche su scala pilota (Federici et al., 1991; Montedoro et al., 1993).

Fenolossidasi fungine extracellulari. Diversi studi finalizzati al disinquinamento delle acque reflue di frantoio sono stati realizzati ricorrendo all'impiego di funghi basidiomiceti afferenti al raggruppamento ecologico degli agenti di carie bianca (white-rot fungi). Questi funghi mostrano una spiccata attitudine degradativa nei confronti di composti aromatici che è connessa al rilascio nell'ambiente extracellulare di ossidasi a bassa specificità di substrato (laccasi, Mn-perossidasi e lignina-perossidasi) che hanno un interesse commerciale per le ampie potenzialità applicative in vari settori industriali e ambientali.

In vari studi effettuati (Martirani et al., 1996; Vinciguerra et al., 1995; D'Annibale et al., 1998; Perez et al., 1998; Fenice et al., 2005), la crescita fungina dava luogo a cospicue riduzioni del carico organico del refluo e del contenuto di molecole aromatiche. Di conseguenza, l'uso dei funghi "white-rot" nel trattamento di AV può essere visto come un trattamento disinquinante che fornisce enzimi di potenziale interesse commerciale.

Lipasi. Alcuni autori hanno dimostrato che utilizzando vari ceppi di *Yarrowia lipolytica* è possibile impiegare le AV come substrato in un processo fermentativo per produrre enzimi ad attività lipolitica e al contempo ottenere un abbattimento del carico organico del refluo finale (Scioli & Vollaro, 1997; Lanciotti et al., 2005).

In genere, le AV sono caratterizzate dalla presenza di una componente lipidica e di quantità variabili olio residuo, che dipendono dall'efficienza del processo di estrazione. Non è sorprendente che i microrganismi lipolitici sono tra i primi colonizzatori delle AV durante lo stoccaggio in serbatoi o lagune areate (Millan et al., 2000) . Dunque, questo refluo rappresenta un possibile e promettente candidato come terreno liquido di crescita potenzialmente adatto per microrganismi capaci di produrre lipasi.

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo smaltimento delle acque di vegetazione dei frantoi oleari costituisce, attualmente, uno dei principali problemi dal punto di vista ambientale, specialmente nei paesi del Mediterraneo dove si concentra la maggior parte della produzione mondiale di olio di oliva e dove non è consentito lo spargimento superficiale.

Le acque di vegetazione sono tra i reflui agro-industriali a più alto tasso inquinante a causa del loro elevato carico organico, caratterizzato soprattutto da composti fenolici e polifenolici ad elevata azione antimicrobica e fitotossica.

La purificazione biologica delle acque di vegetazione è particolarmente difficile poiché questo refluo presenta solidi in sospensione e un elevato carico organico, in particolare polifenoli con attività biostatica e/o biocidi, che riduce fortemente le prestazioni degli impianti di depurazione. Di conseguenza, l'impianto deve prevedere due o più stadi di trattamento che rendono la depurazione complessa e costosa.

Attualmente, la normativa vigente consente in Italia la pratica dello spandimento delle acque di vegetazione sui terreni agrari; nonostante questa risulti, al momento, essere la soluzione migliore sia dal punto di vista pratico che economico, trova attuazione solo se si ha disponibilità di terreni sufficientemente vicini su cui spargere il refluo e comunque deve essere applicata in maniera controllata dal momento che gli eventuali effetti positivi o negativi sulla composizione, sulla carica microbica e la fertilità del terreno sono ancora oggi oggetto di studio. Inoltre, la migrazione di alcuni composti negli strati più bassi del terreno potrebbe causare la contaminazione di eventuali falde acquifere sottostanti con conseguenze per la salute dell'uomo.

Negli ultimi anni sono state proposte soluzioni alternative finalizzate a sfruttare questo refluo, in quanto ricco di composti utili. La valorizzazione delle AV mediante il loro impiego per l'ottenimento di prodotti a medio o alto valore aggiunto attraverso processi fisico-chimici o fermentativi, riveste notevole interesse scientifico.

Nelle AV sono presenti una grande varietà di biomolecole come acidi organici, polialcoli, zuccheri semplici e complessi e lipidi che le rendono una possibile base per i processi fermentativi (Ramos-Cormenzana et al., 1995; Crognale et al., 2003). In virtù del contenuto residuo di lipidi, le AV potrebbero rappresentare un ottimo candidato come terreno liquido di crescita per la produzione di lipasi microbiche.

Lo scopo della presente tesi di dottorato è stato quello di mettere a punto un processo fermentativo per la valorizzazione delle AV mediante produzione microbica di enzimi, in particolare enzimi lipolitici, ottenendo al contempo un abbattimento o quanto meno,

una riduzione del loro potere inquinante. Va tenuto presente che, trattamenti aerobi che diano come esito un abbattimento della concentrazione di fenoli, abbinata ad una riduzione del carico organico, potrebbero costituire una valida forma di pretrattamento a monte della metanogenesi (D'Annibale et al., 2003; Mantzavinos & Kalogerakis, 2005; Crognale et al., 2006). E' noto, infatti, che un limite tecnico collegato all'impiego delle AV, in questi processi è rappresentato dall'effetto inibitorio che la componente fenolica esercita sulla microflora metanogenica.

Esiste una vasta bibliografia in cui viene presa in esame la produzione di lipasi da numerose specie microbiche tra cui *Penicillium* e *Candida*, e sia il terreno che il processo fermentativo per la produzione di questo enzima è stato ampiamente ottimizzato. Nella maggior parte dei casi, una buona produzione di lipasi microbica prevede l'utilizzo di terreni sintetici piuttosto complessi che di certo incidono in maniera significativa sul prezzo finale del prodotto. Inoltre, negli ultimi anni anche la produzione di preparati enzimatici commerciali contenenti lipasi di origine microbica ha avuto un notevole sviluppo. Sigma, Amano, Roche, Novo Nordisk, etc., forniscono preparati lipolitici con varie composizioni e proprietà catalitiche utilizzati in diversi settori: industria alimentare, farmaceutica, dei detergenti e per la produzione di biodiesel.

L'innovazione che dovrebbe introdurre questo lavoro è la produzione microbica di lipasi di possibile interesse industriale utilizzando un substrato costituito da un refluo agro-industriale. Con questa idea, si è cercato di mettere a punto un terreno di produzione a basso costo che permettesse di ottenere buoni livelli di attività e contemporaneamente un abbattimento del carico inquinante del refluo finale.

In prima battuta, è stato effettuato uno screening di microrganismi (funghi e lieviti) in grado di crescere sulle acque di vegetazione producendo lipasi. Con lo scopo di approfondire ulteriormente questo studio, tra i ceppi esaminati sono stati scelti quelli che hanno permesso di raggiungere la maggiore produzione e la migliore produttività. I microrganismi in questione sono stati i funghi *Geotrichum candidum* NRRL 553 e *Penicillium citrinum* NRRL 1841, NRRL 3754 e ISRIM 118 e il lievito *Candida cylindracea* NRRL Y-17506. In via preliminare, per tutti questi ceppi sono stati condotti degli studi per valutare l'effetto di alcuni fattori sulla produzione di lipasi quali tipologia di AV, utilizzo di vari oli come induttori di attività e impiego di diverse fonti di azoto.

A questo punto l'attenzione si è focalizzata su *Penicillium citrinum* NRRL 1841 e *Candida cylindracea* NRRL Y-17506 per i quali si è cercato di ottimizzare le condizioni colturali per la crescita cellulare nell'ottica di migliorarne la produzione enzimatica.

La produzione di lipasi da *P. citrinum* NRRL 1841, utilizzando il terreno a base di AV, è stata ottimizzata in beuta valutando l'effetto del pH iniziale, della concentrazione di azoto e di estratto di lievito secondo un approccio multi-fattoriale. Con il terreno così ottimizzato, al fine di ottenere informazioni sul possibile trasferimento di scala del processo, sono stati condotti altri esperimenti in reattori da banco. Allo scopo, sono stati impiegati due tipi di sistemi, un bioreattore ad agitazione meccanica (STR) e uno ad agitazione pneumatica (Air-lift).

Sebbene tutti i ceppi studiati sono stati in grado di crescere sulle acque di vegetazione e produrre a livelli significativi attività lipolitica, una particolare attenzione è stata poi riservata a *C. cylindracea* (noto anche come *C. rugosa*) per il notevole interesse applicativo della lipasi prodotta da questo lievito. Inizialmente, si è cercato di ottimizzare in beuta la composizione del terreno di produzione (concentrazione dell'olio di oliva, effetto del glucosio, aggiunta di surfactanti e di vari fattori di crescita) e di valutare in via preliminare l'effetto sulla crescita cellulare e sull'attività di alcune condizioni colturali quali velocità di agitazione e aerazione.

Inoltre, con lo scopo di valutare la fattibilità tecnica di un trasferimento di scala del bioprocesso e approfondire la messa a punto del processo fermentativo sono stati condotti una serie di esperimenti in bioreattore da banco ad agitazione meccanica (STR). In particolare, utilizzando il terreno a base di AV ottimizzato, si è cercato di ottimizzare alcuni parametri quali pH, velocità di agitazione e aerazione.

Infine, messo a punto il bioprocesso di produzione della lipasi da *C. cylindracea* coltivata su un terreno a base di AV, si è cercato di identificare il profilo enzimatico del campione grezzo così ottenuto, dal momento che, come è noto dalla letteratura, questo lievito è in grado di produrre fino a sette isoforme ad attività lipolitica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PROVE DI FERMENTAZIONE

3.1.1 Approvvigionamento e caratteristiche del reflu

Le acque di vegetazione utilizzate nel presente lavoro sono state prodotte da differenti frantoi della zona.

Provenienza, campagna olearia, periodo, punto del prelievo e sistema di estrazione dell'olio di ciascun frantoio sono riportati in Tabella 3.1. Le caratteristiche chimiche di ciascun effluente utilizzato sono invece riportate in Tabella 3.2. Le AV sono state direttamente prelevate in fusti di acciaio e conservate, in contenitori di plastica in congelatore a -20°C .

Tabella 3.1 Provenienza, campagna olearia, periodo, punto del prelievo e sistema di estrazione dell'olio di ciascun campione di AV utilizzato nel lavoro.

	Frantoio e luogo	Campagna olearia	Sistema di estrazione	Punto del prelievo
AV 1	PAPI Viterbo	2000/2001 (dic.'00)	3-fasi	Decanter
AV 2	GOLETTI Viterbo	2001/2002 (nov.'01)	3-fasi (BCA*)	Decanter
AV 3	PAPI Viterbo	2001/2002 (nov.'01)	3-fasi	Decanter
AV 4	GOLETTI Viterbo	2001/2002 (febb.'02)	3-fasi	Inferno
AV 5	GOLETTI Viterbo	2003/2004 (nov. '03)	3-fasi	Decanter
AV 6	PAPI Viterbo	2003/2004 (dic. '03)	3-fasi (BCA*)	Decanter
AV 7	GOLETTI Viterbo	2004/2005 (dic. '04)	3-fasi	Decanter
AV 8	GOLETTI Viterbo	2004/2005 (nov. '04)	3-fasi	Inferno
AV 9	PARIS Viterbo	2004/2005 (dic. '04)	3-fasi	Decanter

*BCA, a basso consumo d'acqua.

Tabella 3.2 Caratteristiche chimiche degli effluenti utilizzati nel presente lavoro.

	COD (g/l)	Zuccheri totali (g/l)	COD/ zuccheri totali	Fenoli totali (g/l)	pH	Olio residuo (g/l)	Acidi uronici (g/l)
AV 1	43,0±1,3	17,4±0,5	2,47	2,52±0,11	5,04	0,75±0,05	n.d.
AV 2	51,5±2,1	25,1±1,4	2,05	2,82±0,15	4,88	0,81±0,04	n.d.
AV 3	41,4±2,2	13,2±0,4	3,13	2,77±0,08	4,92	0,73±0,05	n.d.
AV 4	25,6±1,1	8,8±0,5	2,90	1,85±0,10	4,82	0,40±0,03	n.d.
AV 5	49,1±2,3	18,8±1,3	2,61	2,52±0,4	5,13	0,40±0,03	n.d.
AV 6	87,27±0,96	28,17±1,26	3,10	7,44±0,25	5,46	0,27±0,02	2,35±0,53
AV 7	50,56±2,65	15,75±0,35	3,21	4,94±0,05	5,46	1,49±0,03	1,86±0,12
AV 8	48,99±0,141	4,87±0,31	10,06	5,18±0,29	4,65	0,12±0,02	1,35±0,03
AV 9	55,24±1,32	16,75±0,35	3,30	5,68±0,28	5,40	1,04±0,04	1,81±0,23

n.d., non determinato.

3.1.2 Microrganismi utilizzati e mantenimento dei ceppi

Fra i ceppi utilizzati durante la presente tesi di dottorato, dieci sono stati gentilmente forniti dalla ARS Culture Collection (NRRL), United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois, e due dall'Istituto Superiore di Ricerca e Formazione sui Materiali Speciali per le Tecnologie Avanzate (ISRIM), Terni. Di seguito vengono elencati tutti i ceppi utilizzati nel presente lavoro:

- *Penicillium citrinum* NRRL 1841
- *Penicillium citrinum* NRRL 3754
- *Penicillium citrinum* ISRIM 118
- *Aspergillus niger* NRRL 334
- *Aspergillus oryzae* NRRL 485
- *Aspergillus oryzae* NRRL 1988
- *Candida cylindracea* NRRL Y-17506
- *Geotrichum candidum* NRRL Y-552
- *Geotrichum candidum* NRRL Y-553
- *Rhizopus arrhizus* NRRL 2286
- *Rhizopus oryzae* NRRL 6431
- *Rhizopus* sp. ISRIM 383

Durante lo studio le colture sono state mantenute su slants contenenti estratto di malto agarizzato (MEA 50 g/l, OXOID), a 4°C, dopo crescita a 28°C, e periodicamente rinnovate.

3.1.3 Terreni colturali

Prima di essere utilizzate per la preparazione dei terreni colturali, le acque di vegetazione sono state centrifugate (6000 giri/min per 20 minuti) e successivamente filtrate su garza.

Screening dei ceppi e studio preliminare delle condizioni colturali per la produzione di lipasi

Il terreno per il preinoculo è stato preparato utilizzando AV1 diluite 1:2 e addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid) e 0,5 g/l di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Prima della sterilizzazione (121°C per 20 minuti) il pH è stato portato a 6,1 con NaOH 1,0 M.

I terreni colturali per la produzione di lipasi sono stati preparati utilizzando diverse tipologie di AV secondo lo schema seguente:

- prove di screening: AV1 addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid) e 1,0 g/l di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- studio dell'effetto di varie AV: AV1, AV2, AV3 o AV4 addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid) e 1,0 g/l di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- studio dell'effetto della fonte azotata: AV4 addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , NaNO_3 o urea, ciascuno ad una concentrazione tale da ottenere 0,63 g di azoto per litro;
- studio dell'effetto dell'aggiunta di olio: AV4 addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid), 3,0 g/l di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e, dove aggiunto, 3,0 g/l di olio di oliva, di mais o di soia;

Tutti i terreni colturali sono stati prima della sterilizzazione (121°C per 20 minuti) portati a pH 6,1 con NaOH 1,0 M.

Ottimizzazione della produzione di lipasi da *P. citrinum*

Il terreno per il preinoculo è stato preparato utilizzando AV2 diluite 1:2 e addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid) e 0,5 g/l di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Prima della sterilizzazione (121°C per 20 minuti) il pH è stato portato a 6,1 con NaOH 1,0 M.

Se non altrimenti specificato, il terreno colturale per la produzione di lipasi in beuta è stato preparato utilizzando AV2 addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid) e 0,63 g/l di NH_4Cl . Prima della sterilizzazione (121°C per 20 minuti) il pH è stato portato a 6,1 con NaOH 1,0 M.

Per la produzione di lipasi in bioreattore, è stato utilizzato il terreno a base di AV ottimizzato in beuta.

Ottimizzazione della produzione di lipasi da *C. cylindracea*

Il terreno per il preinoculo è stato preparato utilizzando AV7 diluite 1:2 e addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid), 2,4 g/l di NH_4Cl e 3,0 g/l di olio di oliva. Prima della sterilizzazione (121°C per 20 minuti) il pH è stato portato a 6,1 con NaOH 1,0 M.

I terreni colturali per la produzione di lipasi in beuta sono stati preparati secondo lo schema seguente:

- studio dell'effetto di varie AV: AV6, AV7, AV7 diluite 1:2, AV8, AV9 e AV9 diluite 1:2 addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid), 2,4 g/l di NH_4Cl e 3,0 g/l di olio di oliva;
- studio dell'effetto della concentrazione dell'olio di oliva: AV9, diluite 1:2, addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid), 2,4 g/l di NH_4Cl e 0,0, 1,0, 3,0, 5,0, 10,0 g/l di olio di oliva;
- studio dell'effetto dell'aggiunta di glucosio: AV9, diluite 1:2, addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid), 2,4 g/l di NH_4Cl , e, dove aggiunti, 3,0 g/l di olio di oliva e 5,0 g/l di glucosio;
- studio dell'effetto dell'aggiunta di Tween80: AV9, diluite 1:2, addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid), 2,4 g/l di NH_4Cl , 3,0 g/l di olio di oliva e, dove aggiunto, 0,5 g/l di Tween80;
- studio dell'effetto dell'aggiunta di diversi fattori di crescita: AV9 diluite 1:2 addizionate di 2,4 g/l di NH_4Cl , 3,0 g/l di olio di oliva e, dove aggiunti, 0,5 g/l di Estratto di Lievito(Oxoid), 1,0 g/l di Estratto di Malto (Oxoid) e 1 g/l di Peptone;
- studio dell'effetto della velocità di agitazione e dell'aerazione: AV8, diluite 1:2, addizionate di 0,5 g/l di Estratto di Lievito (Oxoid), 2,4 g/l di NH_4Cl e 3,0 g/l di olio di oliva

Per la produzione di lipasi in bioreattore è stato utilizzato il terreno a base di AV ottimizzato in beuta. Tutti i terreni colturali sono stati prima della sterilizzazione (121°C per 20 minuti) portati a pH 6,1 con NaOH 1,0 M.

3.1.4 Condizioni colturali

Per la preparazione dei preinoculi, sono state utilizzate colture su slants incubate per 5 giorni (2 giorni per *C. cylindracea*) a 28°C con le quali si è preparata una sospensione (7 ml per slant) in acqua deionizzata sterile, utilizzata poi per inoculare (1 ml) beute da 250 ml contenenti 49 ml di terreno di preinoculo. Le beute sono state poi incubate a 28°C in agitazione (180 giri/min) per circa 60 ore (48 ore per *C. cylindracea*).

Produzione in beuta

5 ml di precoltura (1×10^6 cell/ml nel caso di *C. cylindracea*) sono stati utilizzati per inoculare beute da 250 ml, contenenti un volume finale di brodo di 50 ml, messe poi ad incubare a 28°C in agitatore orbitale, a 180 giri/min. I prelievi sono stati effettuati ogni 24 ore e sono stati utilizzati per la determinazione della biomassa e/o della crescita microbica. Gli stessi campioni sono stati centrifugati (8000 giri/min per 10 min) ed i surnatanti sono stati utilizzati per determinare l'attività enzimatica, COD, zuccheri totali e fenoli totali.

Produzione in bioreattore

Per le prove in bioreattore sono stati utilizzati: un fermentatore ad agitazione meccanica (STR: Stirred Tank Reactor) da 3 litri (Applikon dependable instruments, Schiedam, NL) fornito di due giranti di tipo Rushton del diametro di 4,5 cm a sei pale, di tre frangiflutti (larghezza pari a 1,4 cm) e di uno sparger a pipe posto alla base del fermentatore, al di sotto delle turbine; un fermentatore Air-lift a colonna di bolle da 1,5 litri (Figura 3.1).

Il monitoraggio di alcuni parametri durante la fermentazione è stato effettuato attraverso l'installazione di sensori; in particolare, sono stati utilizzati un elettrodo polarografico (Applisens, Holland) per la valutazione dell'ossigeno disciolto ed uno per le misurazioni di pH (pHoenix Electrode Company, Huston, Texas, USA) collegati ad un biocontrollore con microprocessore (tipo P.I.D.) ADI 1030 (Applikon Dependable Instruments, Holland). Il monitoraggio dell'anidride carbonica e dell'ossigeno in uscita dai reattori STR durante la fermentazione è stato effettuato con un analizzatore Binos® 100 2M (NDIR-/Oxygen analyzer, Rosemount Analytical). Lo strumento è stato calibrato con una miscela di ossigeno (20,03%) e di anidride carbonica (4,97%) a concentrazione nota e rispettivamente ad un flusso ottimale di 1 v/v minuto.



Figura 3.1 Foto fermentatori: A) fermentatori da banco STR contenenti il terreno a base di AV; B) fermentatore da banco Airlift (a sinistra) e fermentatore da banco STR (a destra).

La velocità di trasferimento dell'ossigeno ($Q_{O_2}X$ o anche espresso come OTR) è stato determinato secondo il metodo statico (Badino et al., 2001). Mediante il metodo di bilanciamento dei gas, l' $Q_{O_2}X$ è stato calcolato con il bilanciamento di massa dell'ossigeno nella fase gassosa secondo la seguente espressione:

$$Q_{O_2}X = (n_{in}Y_{O_2}^{in} - n_{out}Y_{O_2}^{out})/V$$

Dove:

V = volume di brodo (ml),

n_{in} = portata molare del gas in ingresso;

$Y_{O_2}^{in}$ = frazione molare dell'ossigeno in entrata;

n_{out} = portata molare del gas in uscita;

$Y_{O_2}^{out}$ = frazione molare dell'ossigeno in uscita.

I valori di n_{in} sono stati ricavati dalla portata volumetrica utilizzando le legge dei gas perfetti e quelli di n_{out} sono stati calcolati dal bilanciamento di massa dell'azoto nella fase gassosa, secondo la seguente equazione:

$$n_{out} = 0,79n_{in}/(1 - Y_{O_2}^{out} - Y_{CO_2}^{out})$$

Dove:

$Y_{CO_2}^{out}$ = frazione molare dell'anidride carbonica in uscita.

Il coefficiente volumetrico di trasferimento di massa dell'ossigeno (K_La) di entrambi i bioreattori (STR e Airlift) è stato determinato mediante il metodo di Wise (1951) utilizzando acqua deionizzata e le acque di vegetazione a differenti velocità di agitazione (300, 500 e 700 giri/min, per il reattore STR) e ad un flusso di aria di 1v/v per minuto: in particolare è stata studiata la fase di risalita dell'ossigeno disciolto che inizia al momento in cui viene insufflata aria, partendo da un valore di ossigeno disciolto pari allo 0% di saturazione, e termina quando l'ossigeno disciolto raggiunge la concentrazione di saturazione. Gli incrementi dei livelli di ossigeno disciolto sono stati registrati in continuo ad intervalli di tempo regolari (1 min) tramite l'elettrodo polarografico. L'aumento dell'ossigeno disciolto può essere rappresentato dalla seguente equazione:

$$OTR (Q_{O_2}X) = dC_L/dt = K_La (C^* - C_L)$$

Dove:

DC_L/dt = aumento della concentrazione di OD durante il periodo di aerazione;

K_L = coefficiente di trasferimento all'interfaccia di fase;

a = superficie specifica di scambio;

$K_L a$ = coefficiente volumetrico di trasferimento dell'ossigeno (h^{-1});

C^* = valore di saturazione del gas disciolto (mM/l)

C_L = concentrazione del gas disciolto (mM/l).

Integrando l'equazione si ottiene:

$$\ln(C^* - C_L) = -K_L a * t$$

Rappresentando graficamente il $\ln(C^* - C_L)$ in funzione del tempo, si ottiene una retta con pendenza pari a $-K_L a$.

Tutti i reattori utilizzati, sono stati inoculati con un pre-inoculo, preparato come precedentemente descritto.

Per la produzione di lipasi da *P. citrinum* in STR ed Air-lift, le condizioni standard di fermentazione sono state le seguenti: flusso d'aria 1 v/v per minuto; temperatura 28°C; velocità di agitazione (ad eccezione dell'Air-lift) 500 giri/min; inoculo 5% (v/v); antischiuma siliconico (Antifoam 289, Sigma) 0,5 ‰.

Per la produzione di lipasi da *C. cylindracea* in STR, le condizioni standard di fermentazione sono state le seguenti: flusso di aria 1 v/v per minuto; temperatura 28°C; inoculo di 1×10^6 cell/ml; antischiuma siliconico (Antifoam 289, Sigma) 0,5 ‰.

E' stato studiato l'effetto del pH sulla produzione di lipasi da *C. cylindracea* in STR lavorando a pH libero (pH iniziale 6,1), a pH mantenuto costante a 6,5 mediante l'aggiunta di NaOH 4,0 M e HCl 4,0 M e a pH minore di 6,5 mediante l'aggiunta di HCl 4,0 M. Inoltre, è stato valutato l'effetto della velocità di agitazione e dell'aerazione, in particolare sono state studiate tre diverse velocità di agitazione, 300, 500 e 700 giri/min. Infine, sono stati condotti degli esperimenti in cui la velocità di agitazione è stata controllata automaticamente attraverso un microprocessore (Stirrer controller P100 ADI 1032, Applikon Dependable Instruments, Holland) tra 300 e 800 giri/min per mantenere l'ossigeno disciolto nel mezzo superiore al 20% di saturazione.

3.1.5. Ottimizzazione del terreno colturale per la produzione di lipasi da *Penicillium citrinum*: disegno fattoriale

Il terreno a base di AV per la produzione di lipasi da *P. citrinum* è stata ottimizzata utilizzando un modello composito centrale (Montgomery, 1997; Burkert et al., 2004). Le variabili di processo, analizzate in questo studio sono state: concentrazione di NH_4Cl (N), X_1 ; concentrazione di Estratto di lievito (YE), X_2 ; pH iniziale, X_3 . Nel disegno fattoriale sono state incluse 17 tesi, 14 combinazioni delle variabili e tre punti centrali (Tabella 3.3). Le variabili sono codificate o standardizzate come valori dimensionali ottenuti dalla seguente equazione:

$$X_i = (A_i - A_0) / \Delta A \quad i = 1, 2, 3, \dots, k,$$

dove X_i è un valore codificato (adimensionale), A_i è il valore reale della variabile, A_0 è il valore reale della stessa variabile al punto centrale e ΔA è la differenza tra il valore al livello massimo e al punto centrale della variabile.

I dati sono soggetti all'analisi della varianza (ANOVA) e sono descritti mediante la seguente equazione polinomiale di secondo ordine:

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j$$

dove y è la risposta dell'esperimento, b_0 è l'intercetta, b_i è il coefficiente lineare e b_{ij} è il coefficiente di interazione, X_i e X_j sono le forme delle variabili d'ingresso codificate come precedentemente descritto.

Sono state assunte come variabili di risposta dell'esperimento i seguenti parametri: produzione di lipasi, riduzione percentuale di fenoli e riduzione percentuale di COD.

Il modello fattoriale è stato replicato due volte. L'analisi statistica dei risultati e lo studio della superficie di responso è stata condotta con il software MODDE 5.0 (Umetrics AB, Umeå, Sweden).

Tabella 3.3 Disegno fattoriale: sono riportati i valori reali delle variabili indipendenti quali concentrazione di cloruro di ammonio (X_1), concentrazione di estratto di lievito (X_2) e pH iniziale (X_3). I valori codificati delle variabili di ingresso sono mostrati in parentesi tonda.

Tesi	Variabili indipendenti		
	X_1 (NH ₄ Cl)	X_2 (estratto di lievito)	X_3 (pH iniziale)
1	- 1 (2)	-1 (0.5)	-1 (5.1)
2	+1 (4)	-1 (0.5)	-1 (5.1)
3	- 1 (2)	+1 (1.5)	-1 (5.1)
4	+1 (4)	+1 (1.5)	-1 (5.1)
5	- 1 (2)	-1 (0.5)	+1 (7.1)
6	+1 (4)	-1 (0.5)	+1 (7.1)
7	-1 (2)	+1 (1.5)	+1 (7.1)
8	+1 (4)	+1 (1.5)	+1 (7.1)
9	-1 (2)	0 (1.0)	0 (6.1)
10	+1 (4)	0 (1.0)	0 (6.1)
11	0 (3)	-1 (0.5)	0 (6.1)
12	0 (3)	+1 (1.5)	0 (6.1)
13	0 (3)	0 (1.0)	-1 (5.1)
14	0 (3)	0 (1.0)	+1 (7.1)
15	0 (3)	0 (1.0)	0 (6.1)
16	0 (3)	0 (1.0)	0 (6.1)
17	0 (3)	0 (1.0)	0 (6.1)

3.2 METODI ANALITICI

3.2.1 Determinazione della biomassa

La concentrazione di biomassa microbica è stata misurata attraverso la stima del peso secco (g di biomassa secca/l di coltura): campioni di brodo sono stati filtrati su filtri Whatman GF/C pre-pesati (47 mm), la biomassa raccolta è stata lavata con acqua deionizzata e il filtro è stato seccato a 105 °C per 24 h, raffreddato in essiccatore e pesato.

Per le prove con *C. cylindracea*, la crescita cellulare è stata anche determinata spettrofotometricamente a 600 nm; sulla base di opportune rette di correlazione fra densità ottica e concentrazione cellulare, la crescita è stata, quindi, espressa in cell/ml.

3.2.2 Determinazione dell'attività enzimatica

Il saggio per l'attività *lipasica* è stato effettuato sui surnatanti ottenuti dalla centrifugazione dei campioni prelevati (6000 giri/min per 5 minuti). L'attività lipasica viene determinata spettrofotometricamente a 540 nm utilizzando come substrato il β -naftilmiristato (BNM) (Versaw et al., 1989). La miscela di reazione contiene 50 μ l di una soluzione stock di BNM (20 mM in n-propanolo), 2,02 ml di tampone fosfato 50 mM pH 7,2 contenente 0,5% di Triton X-100 (p/V) ed un volume opportuno di campione (5-30 μ l). La miscela di reazione viene incubata a 40°C per 10', al termine dei quali, vengono aggiunti 20 μ l di una soluzione stock di Fast blue BB salt (100 mM in dimetilsolfossido, DMSO); l'incubazione viene prolungata di ulteriori 5' per consentire la reazione di accoppiamento tra il sale di diazonio e il β -naftolo liberato. Allo scadere dei 15' complessivi di incubazione la reazione viene interrotta con 200 μ l di acido tricloroacetico 0,7 N (TCA). A ciascuna provetta viene poi aggiunto del cloruro di sodio (NaCl) al fine di agevolare la successiva fase di estrazione del prodotto di accoppiamento evitando la formazione di emulsioni. L'estrazione viene condotta mediante aggiunta sequenziale di 3 ml di acetato di etile e 1 ml di etanolo e successiva agitazione su vortex. La fase organica superiore viene letta allo spettrofotometro a 540 nm.

L'attività enzimatica viene espressa in unità internazionali (UI). Una UI è definita come la quantità di enzima in grado di liberare 1 μ mole di β -naftolo in un minuto nelle condizioni di saggio impiegate. A tal fine è stata costruita una retta di taratura con concentrazioni note di β -naftolo e successiva analisi di regressione lineare dei dati ottenuti ($r^2 = 0,98$, $p < 0,05$).

L'attività *malato-deidrogenasica* sui surnatanti ottenuti dalla centrifugazione dei campioni prelevati durante le fermentazioni sono state effettuate come riportato da Li & Chen (1994). La malato-deidrogenasi catalizza la conversione del L-malato e dell'ossalacetato utilizzando NAD come coenzima. La velocità di reazione è determinata misurando il decremento dell'assorbimento a 340 nm dovuta all'ossidazione del NADH. Una unità (U) di attività malato-deidrogenasica è stata definita come la quantità di enzima che ossida 1 μ mole di NADH per ml per minuto. La malato-deidrogenasi è presente in tutte le cellule eucariote. I reagenti utilizzati sono stati: tampone fosfato 0,1 M pH 7,4, Tris-HCl 0,05 M pH 7,4, acido ossalacetico 0,006 M in tampone fosfato 0,1 M pH 7,4 (questa soluzione è piuttosto instabile e dovrebbe essere conservata in ghiaccio durante l'uso) e NADH 0,00375 M in tampone Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. In cuvetta sono stati messi 2,6 ml di tampone fosfato, 0,2 ml di NADH e 0,1 ml di ossalacetato. La miscela è stata lasciata 3-4 minuti equilibrare alla temperatura di 30 °C e poi è stato fatto il bianco. Successivamente sono stati aggiunti 0,1 ml di campione opportunamente diluito ed è stato seguito il decremento a 340 nm per 2 minuti. Infine, è stato calcolato il ΔA_{340} per minuto nella porzione lineare della curva:

$$U/mg = (\Delta A_{340}/min)/(6,2 * mg \text{ di enzima}/ml \text{ di miscela di reazione})$$

3.2.3 Determinazione della domanda chimica di ossigeno (COD)

La determinazione del COD (Chemical Oxygen Demand) consente il dosaggio delle sostanze ossidabili chimicamente da parte di un energico ossidante (bicromato di potassio, $K_2Cr_2O_7$) in soluzione fortemente acida secondo la metodica definita nei protocolli IRSA-CNR (1972). Il risultato si esprime in mg/l di O_2 che equivalgono alla quantità di ossidante necessaria per la reazione.

La determinazione del COD è l'unico metodo non strumentale che consente di avere un'indicazione sul carico inquinante organico anche in presenza di sostanze tossiche.

La determinazione del COD viene eseguita mediante retrotitolazione, in presenza di un opportuno indicatore, dell'eccesso di una quantità nota di un forte ossidante (bicromato di potassio) posto precedentemente a reagire in condizioni controllate con la soluzione contenente sostanze ossidabili chimicamente. La quantità di sostanze ossidabili è proporzionale al bicromato di potassio consumato nel corso della reazione.

Il bicromato di potassio è in grado di ossidare anche altre sostanze presenti come i solfiti e i cloruri; perciò è necessario eliminare questa interferenza con l'aggiunta di solfato di mercurio.

Per la determinazione è stato usato un incubatore ad alta temperatura modello ECO 6 con programma automatico (Velp Scientifica s.r.l., Milano).

Reagenti usati:

- ✓ soluzione di $K_2Cr_2O_7$ 0,25 N;
- ✓ $HgSO_4$;
- ✓ H_2SO_4 concentrato al 98% contenente Ag_2SO_4 (0,07%);
- ✓ soluzione standard di $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ca. 0,1 N (sale di Mohr);
- ✓ indicatore: o-fenantrolina/solfato ferroso.

Procedimento: 10 ml della soluzione di bicromato miscelati nell'ordine con 1 punta di spatola di solfato di mercurio, 30 ml di acido solforico concentrato e 20 ml di campione (acqua per il bianco), sono fatti bollire per 2 ore in provette dotate di refrigerante a ricadere alla temperatura di 190 °C. Al termine dell'incubazione si lascia raffreddare, sono aggiunti 80 ml di acqua distillata e 3-4 gocce di indicatore. Si retrotitola l'eccesso di bicromato (viraggio dal verde all'arancio) con la soluzione 0,1 N di solfato ferroso ammonico (sale di Mohr). La titolazione si esegue su tutti i campioni compreso il bianco. Il COD di ciascun campione, espresso in mg/l, si ottiene impiegando la formula:

$$COD (mg/l) = (V_1 - V_2) N 8000 d / V$$

dove:

V_1 = volume di standard usato per la titolazione del bianco

V_2 = volume usato per la titolazione del campione

V = volume del campione analizzato

N = normalità della soluzione del sale di Mohr

8000 = peso equivalente dell'ossigeno in mg

d = diluizione del campione effettuata

3.2.4 Determinazione degli zuccheri totali

Per la determinazione degli zuccheri totali si è utilizzato il saggio di Dubois et al. (1956) che si basa sull'idrolisi dei legami glicosidici da parte dell'acido solforico concentrato e nella successiva deidratazione dei monosaccaridi. I prodotti deidratati

reagiscono con il fenolo per dare un colore arancio misurabile spettrofotometricamente (490 nm).

Reagenti usati:

- ✓ 50 g/l di fenolo in cristalli;
- ✓ H_2SO_4 concentrato al 98%.

Procedimento: in cuvetta vengono miscelati nell'ordine 200 μl di campione, 200 μl di soluzione di fenolo e 1 ml di acido solforico. Si lascia reagire per 30 minuti e si misura l'assorbanza a 490 nm. La retta di taratura è stata ottenuta utilizzando come standard glucosio nel range 0-200 $\mu\text{g/l}$.

3.2.5 Determinazione dei fenoli totali

La determinazione dei fenoli totali è stata eseguita come riportato da Singleton et al. (1971). Questo metodo è basato sull'impiego del reattivo di Folin-Ciocalteu, costituito da una miscela di acido fosfotungstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) o fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). In ambiente basico (carbonato di sodio, Na_2CO_3), questi acidi reagiscono con gli OH fenolici e danno vita ad una miscela di ossidi di tungsteno (W_8O_{23}) e molibdeno (Mo_8O_{23}), di colore blu che assorbono in un range compreso tra 720-770 nm. I risultati vengono espressi in equivalenti di tirosolo.

Reagenti usati:

- ✓ reattivo di Folin-Ciocalteu (Fluka, Buchs, Switzerland) diluito 1:10 in acqua distillata;
- ✓ soluzione di Na_2CO_3 al 7,5% in acqua distillata.

Procedimento: a 20 μl di campione sono stati aggiunti 180 μl di acqua, 1 ml di reattivo Folin-Ciocalteu e, dopo aver atteso almeno 30 secondi ma prima di 8 minuti, 800 μl della soluzione di Na_2CO_3 . Viene misurata l'assorbanza del cromoforo a 760 nm dopo incubazione al buio per 2 ore. La retta di taratura è stata ottenuta utilizzando una serie di diluizioni a concentrazioni note di tirosolo.

3.2.6 Determinazione dell'olio nelle AV

La determinazione dell'olio nelle acque di vegetazione è stata effettuata mediante estrazione in n-esano.

In un imbuto separatore sono stati messi 50 ml di n-esano e 25 ml di AV preventivamente centrifugate e filtrate. Sono stati agitati con vigore ed è stata aggiunta una soluzione satura di NaCl, per rompere l'emulsione.

La fase organica finale, ottenuta dopo le quattro estrazioni (50 ml di n-esano aggiunti alla fase acquosa), è stata rimessa nell'imbuto separatore con soluzione satura di NaCl (rapporto 1:2) e la fase organica è stata trasferita in una beuta pulita in cui è stato aggiunto bisolfito di sodio anidro, per eliminare l'eventuale acqua presente; infine è stata fatta una filtrazione.

La fase organica anidra è stata trasferita in un pallone da 250 ml, precedentemente pesato ed è stato portato a secco il contenuto mediante ROTAVAPOR. A questo punto è stato determinato il peso del pallone e poi l'estratto è stato ridisciolti in 2 ml di metanolo. Essendo presenti anche piccole quantità di fenoli, è stato determinato il loro contenuto sull'estratto con il saggio dei polifenoli totali ed è stato sottratto a quello dell'estratto secco (concentrazione di olio).

3.2.7 Determinazione degli acidi uronici

Preliminarmente, si è proceduti alla deesterificazione delle pectine nel seguente modo (Mesenguer et al., 1998): a quattro ml di campione di AV sono stati aggiunti 10 ml di EDTA 0,5%; il pH è stato portato a 11,5 con NaOH 1 N e i campioni sono stati incubati a 25 °C per 25 minuti, poi sono stati acidificati fino a pH 5,5 con acido acetico al 99,5%. Successivamente è stata determinata la concentrazione degli acidi uronici, utilizzando i seguenti reagenti (Blumenkrantz & Absoe-Hansen, 1973):

- ✓ EDTA 0,5% p/v
- ✓ NaOH 1 N
- ✓ Acido acetico glaciale 99,5%
- ✓ Acido galatturonico (per la retta di taratura)
- ✓ Soluzione di m-idrossidifenile 0,15% w/v in NaOH 0,5% w/v
- ✓ Soluzione di H₂SO₄ conc./sodio tetraborato 0,0125 M

A 200 µl di campione o di standard (contenente da 0,5 a 20 µg di acidi uronici) sono stati aggiunti 1,2 ml di H₂SO₄ conc./sodiotetraborato 0,0125 M. La miscela è stata agitata e poi lasciata raffreddare in ghiaccio per 2 minuti, dopodiché è stata agitata con il vortex e riscaldata a 100 °C per 5 minuti. La miscela di reazione è stata raffreddata di nuovo in ghiaccio per 5 minuti e sono stati addizionati 20 µl di m-idrossidifenile 0,15% in NaOH 0,5%, e dopo agitazione è stata letta l'assorbanza a 520 nm.

Poiché i carboidrati producono una colorazione rosa con H₂SO₄ conc./sodiotetraborato a 100 °C, un campione (bianco) è stato fatto reagire senza aggiungere il reagente (m-idrossidifenile) che è stato sostituito da 20 µl di NaOH 0,5%. L'assorbimento a 520 nm

è stato sottratto a quello totale.

3.2.8 Determinazione del pH

Il pH è stato misurato con un elettrodo combinato collegato ad un pH metro (AMEL, Milano). La taratura dello strumento è stata eseguita impiegando due soluzioni tampone standard a pH noto (4,0 e 7,0).

3.2.9 Determinazione delle proteine totali

Per la determinazione delle proteine totali è stato utilizzato il metodo proposto da Bradford (1976). E' stato utilizzato il reattivo Bio-Rad Protein Assay, costituito da una soluzione acida di Coomassie Brilliant Blue G-250. A 800 µl di campione opportunamente diluito sono stati aggiunti 200 µl di reagente. Dopo aver agitato la miscela di reazione, è stata lasciata incubare per 15 minuti e poi è stata letta l'assorbanza a 595 nm contro un bianco costituito da 800 µl di acqua deionizzata e 200 µl di reattivo. La retta di taratura è stata costruita preparando una serie di diluizioni di una soluzione madre di albumina da siero bovino (BSA) nell'intervallo tra 1 e 25 µg/ml.

3.2.10 Elettroforesi in presenza di SDS (SDS-PAGE), in condizioni native (NATIVE-PAGE) e in condizioni parzialmente denaturanti e non riducenti su gel di poliacrilammide

Gli esperimenti di elettroforesi su gel di poliacrilammide sono stati condotti su apparati verticali Mini-protean II (Biorad) secondo le istruzioni fornite dalla ditta.

I reagenti utilizzati sono stati i seguenti:

- ✓ Soluzione di acrilammide/bis(acrilammide) [29%/1% (p/v)] (soluzione **A**)
- ✓ Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (soluzione **B**)
- ✓ Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (soluzione **C**)
- ✓ SDS 10% (p/v), solo per SDS-PAGE
- ✓ Ammonio persolfato (APS) 10% (p/v)
- ✓ H₂O deionizzata
- ✓ N,N,N,N-tetrametilendiammina (TEMED)
- ✓ Soluzione satura di isobutanolo
- ✓ Running buffer stock 10X (Tris-HCl 30 g/l; glicina 144 g/l; SDS 5 g/l, solo per SDS-PAGE e in condizioni parzialmente denaturanti) pH 8,3

- ✓ Sample buffer (glicerolo 0,8 ml; blu di bromofenolo 0,05% 0,2ml; Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 1 ml; SDS 10% (p/v) 1,6 ml, solo per SDS-PAGE; β -mercaptoetanol 0,4 ml, solo per SDS-PAGE; H₂O deionizzata tanta da arrivare ad un volume finale di 8 ml)

Il gel spaziatore è stato preparato al 4%, miscelando le soluzioni sopra descritte secondo le proporzioni mostrate nella seguente tabella:

Reagenti	Volumi per 2 gels (ml) SDS-PAGE	Volumi per 2 gels (ml) NATIVE-PAGE
H ₂ O	6,3	6,4
Soluzione C	2,5	2,5
Soluzione A	1	1
SDS 10%	0,1	--
APS 10%	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,01

Il gel separatore è stato preparato a varie porosità (T%), miscelando le soluzioni sopra descritte secondo le proporzioni mostrate nella seguente tabella:

Reagenti	Volumi (ml) 2 gels T%=7,5	Volumi (ml) 2 gels T%=10	Volumi (ml) 2 gels T%=12	Volumi (ml) 2 gels T%=15
H ₂ O	5,625	5,0	4,5	3,75
Soluzione B	2,5	2,5	2,5	2,5
Soluzione A	1,875	2,5	3,0	3,75
SDS 10% (egual volume di H ₂ O per NATIVE-PAGE)	0,1	0,1	0,1	0,1
APS 10%	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,01

Le miscele di reazione sono state degasate sotto vuoto e SDS, quando richiesto, APS e TEMED sono stati aggiunti prima di inserire le miscele nell'apparato di polimerizzazione verticale.

Dopo che il gel separatore è stato colato, è stata applicata una soluzione satura di isobutanolo per livellare il fronte. Al termine della polimerizzazione del gel separatore, dopo aver eliminato l'isobutanolo, sono stati applicati i pettini ed è stato colato il gel spaziatore. Dopo la polimerizzazione del gel spaziatore sono stati rimossi i pettini e i pozzetti sono stati lavati con acqua e asciugati. A questo punto sono stati caricati i campioni, previa miscelazione con il Sample buffer. Il Running buffer è stato diluito 10 volte e introdotto nella camera di corsa. La corsa elettroforetica è stata programmata,

mediante un alimentatore Power Pac 3000 (Biorad), ad un voltaggio costante di 200 V. La durata media di una corsa è stata di circa 45 minuti.

Alcuni esperimenti di elettroforesi su gel di poliacrilammide sono stati condotti in condizioni parzialmente denaturanti e non-riducenti; quindi, dal punto di vista operativo il gel spaziatore, il gel separatore e il Running buffer sono stati preparati secondo il protocollo per le condizioni di SDS-PAGE, mentre il Sample buffer è stato preparato secondo il protocollo per la NATIVE-PAGE. Inoltre, i campioni caricati sul gel non sono stati denaturati al calore come invece prevede il procedimento per le condizioni di elettroforesi in presenza di SDS.

3.2.11 Isoelettrofocalizzazione analitica su gel di poliacrilammide (IEF-PAGE)

Gli esperimenti di IEF-PAGE analitica sono stati condotti su un apparato orizzontale Mini-IEF mod. 111 della Biorad utilizzando un intervallo di pH compreso tra 2,8 e 6,6 ottenuto miscelando anfoliti della BDH (Resolyte 2-5 e Resolyte 3,0-6,5).

Sono stati impiegati i seguenti reagenti:

- ✓ Acrilammide 29,1% (soluzione **A**)
- ✓ Metilene-bis(acrilammide) 0,9% (soluzione **B**)
- ✓ Glicerolo 90%
- ✓ H₂O
- ✓ Resolyte 2-5 (1,66%)
- ✓ Resolyte 3,0-6,5 (0,5%)
- ✓ Ammonio persolfato (APS) 10% (p/v)
- ✓ N,N,N,N-tetrametilediammina (TEMED)
- ✓ Riboflavina (4 mg/100ml di acqua)

Al fine di ottenere due gel di spessore pari a 0,4 mm le soluzioni sopra descritte sono state miscelate nelle proporzioni mostrate nella seguente tabella:

Reagenti	Volumi (ml) per due gels T% = 5,03
Soluzione A	2,05
Soluzione B	1,85
Glicerolo	1,4
H ₂ O	5,46
Resolyte 2-5	0,50
Resolyte 3,0-6,5	0,15
Riboflavina	0,90
APS	0,07
TEMED	0,024

Volume totale	12,184
---------------	--------

La miscela di reazione è stata degasata sotto vuoto e APS e TEMED sono stati aggiunti prima di inserire la miscela in un apparato di polimerizzazione orizzontale.

Una volta caricati i campioni opportunamente diluiti (2 µl) è stato applicato il seguente programma di corsa: 100 V per 15 minuti; 200 V per 15 minuti; 350 V per 15 minuti e 450 V per 25 minuti.

3.2.12 Colorazione per attività del gel di poliacrilammide

La colorazione di attività su gel della lipasi è stata eseguita secondo la seguente procedura: prima della colorazione il gel è stato equilibrato con tampone fosfato 0,05 M pH 7,2 e poi messo ad incubare con il substrato (β -naftilbutirrato). Quest'ultimo è stato preparato come segue (le quantità sono riferite a 100 ml di soluzione): 50 mg sciolti in 1 ml di n-propanolo sono stati aggiunti al tampone fosfato 0,05 M pH 7,2 contenente 0,2% di Triton X-100; immediatamente prima di colorare il gel alla soluzione sono stati aggiunti 38 mg di Fast Blue BB sciolti in 800 µl di dimetilsolfossido.

La colorazione del gel è stata fatta a temperatura ambiente e sotto lieve agitazione. Dopo lo sviluppo delle bande di attività, la reazione è stata bloccata immergendo il gel in una soluzione MeOH/H₂O/acido acetico (2:5:1).

3.2.13 Colorazione per proteine del gel di poliacrilammide

La colorazione del gel per visualizzare le bande proteiche è stata effettuata sia con Coomassie Brilliant Blue G-250 (colloidale) come riportato da Neuheff et al. (1988) sia con Silver come riportato da Merril et al. (1984).

La colorazione con Coomassie colloidale è stata fatta secondo il seguente protocollo: dopo la corsa il gel è stato fissato per 60 minuti con una soluzione di acido tricloroacetico (TCA) 12% (p/v); successivamente il gel è stato colorato con una soluzione costituita da acido fosforico 2% (p/V), coomassie colloidale 0,15%, ammonio solfato 10% e metanolo 10%; infine, dopo la comparsa delle bande, il gel è stato immerso per 1 minuto in una soluzione MeOH/H₂O/acido acetico (4:1,5:10) poi in una soluzione di metanolo 25%.

La colorazione con Silver è stata fatta secondo il seguente protocollo:

- a) il gel è stato fissato in TCA 20% per circa due ore sotto agitazione
- b) 2 lavaggi in etanolo o metanolo 10% per 15 minuti
- c) immersione in soluzione di oxidizer (100 mg di potassio di cromato e 33 µl di acido nitrico conc. in 100 ml di acqua deionizzata) per 20 minuti

- d) 3 lavaggi con acqua per una durata complessiva di 20 minuti
- e) immersione in Silver (200 mg di nitrato di argento in 100 ml di acqua)
- f) lavaggio con acqua per 1 minuto
- g) sviluppo in developer (2,5 g di carbonato di sodio e 50 μ l di formaldeide in 100 ml di acqua) tenuto precedentemente a 10 °C per rallentare lo sviluppo
- h) stop con acido acetico 3% per 10 minuti
- i) lavaggio con acqua distillata.

3.2.14 Determinazione del peso molecolare

La determinazione del peso molecolare (PM) delle varie isoforme della lipasi presenti nel campione grezzo è stata effettuata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide caricando una miscela di standard pre-colorati a peso molecolare noto (Caleidoscope Standards, Biorad) (Tabella 3.4). La curva di calibrazione e l'equazione della retta di regressione lineare sono riportate in Figura 3.2.

3.2.15 Determinazione del punto isoelettrico

La determinazione del punto isoelettrico (pI) delle varie isoforme della lipasi presenti nel campione grezzo è stata effettuata mediante isoelettrofocalizzazione analitica su gel di poliacrilammide utilizzando un intervallo di pH compreso tra 2,8 e 6,6 ottenuto miscelando anfoliti della BDH (Resolyte 2-5 e Resolyte 3,0-6,5). Al termine della corsa il gradiente di pH è stato determinato incubando per 30 minuti porzioni di gel prelevate a distanze note dal catodo in una soluzione 10 mM di KCl preventivamente degasate mediante insufflamento di azoto. Le misure di pH ottenute in funzione dalla distanza dal catodo sono state analizzate mediante un modello di regressione lineare (Tabella 3.5). La curva di calibrazione e l'equazione della retta di regressione lineare sono riportate in Figura 3.3.

3.2.16 Analisi statistica dei dati

Tutte le prove sono state condotte in triplicato. La significatività dei dati ottenuti nei vari esperimenti è stata valutata tramite l'analisi della varianza (ANOVA) e procedure di comparazione multipla (test di Tukey), utilizzando il software di statistica SigmaStat, versione 2.0 (Jandel Corp. , San Rafael, Ca, USA).

Tabella 3.4 Proteine, colore, peso molecolare (**PM**), logPM, migrazione delle bande (cm) ed **Rf** (rapporto tra la distanza di migrazione della banda e il fronte di blu di bromofenolo) dello standard pre-colorato utilizzato per la determinazione del peso molecolare mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (15%) eseguita in condizioni parzialmente denaturanti e non-riducenti

Standard	Colore	PM (KDa)	logP M	Migrazione (cm)	Rf
Miosina	Blu	208,0	2,318	0,15±0,07	0,027±0,011
B-galattosidasi	Magenta	144,0	2,158	0,25±0,07	0,046±0,010
Albumina da siero bovino	Verde	87,0	1,940	0,65±0,07	0,119±0,005
Anidrasi carbonica	Viola	44,1	1,644	1,50±0,00	0,276±0,018
Inibitore della tripsina di soia	Arancio	32,7	1,515	2,15±0,07	0,396±0,039
Lisozima	Rosso	17,7	1,248	3,45±0,35	0,632±0,024
Aprotinina	Blu	7,1	0,851	4,50±0,00	0,789±0,000
Blu di bromofenolo	Blu	--	--	--	1

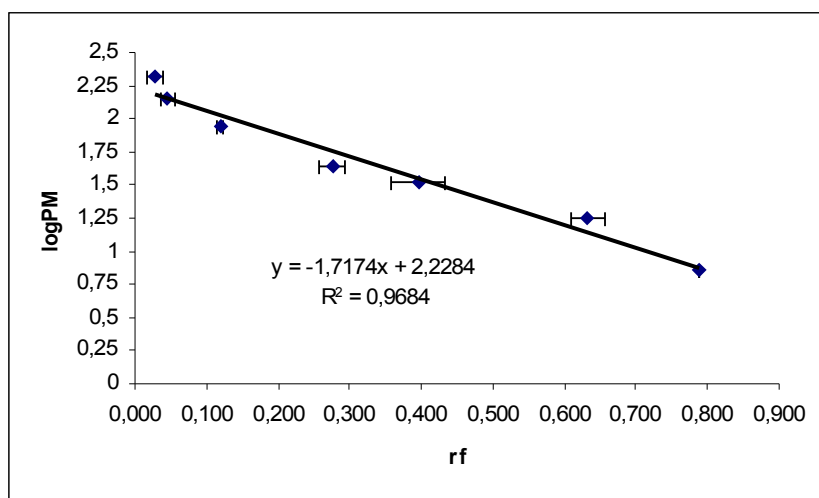


Figura 3.2 Curva di calibrazione (logPM vs Rf) e retta di regressione lineare per la determinazione del peso molecolare (**PM**) mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide (15%) in condizioni parzialmente denaturanti e non riducenti utilizzando gli standard pre-colorati a peso molecolare noto (**Rf**: rapporto tra la distanza di migrazione della banda e il fronte di blu di bromofenolo).

Tabella 3.5 Misure di pH in funzione della distanza dal catodo del gradiente ottenuto mediante isoelettrofocalizzazione su gel di poliacrilammide utilizzando Resolyte 2-5 e Resolyte 3,0-6,5 con il seguente programma di corsa: 100 V per 15 minuti; 200 V per 15 minuti; 350 V per 15 minuti e 450 V per 25 minuti.

Distanza dal catodo (cm)	pH
5	2,75
4	3,81
3	4,36
2	5,20
1	6,01
0	6,80

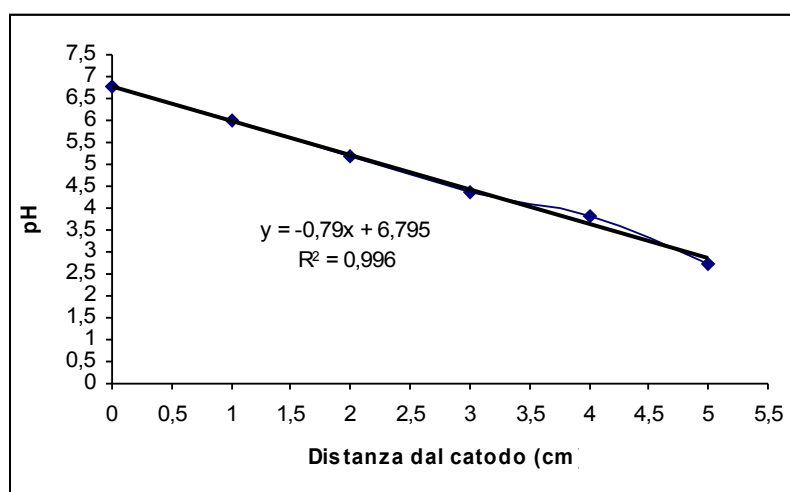


Figura 3.3 Curva di calibrazione (pH vs cm) e retta di regressione lineare per la determinazione del punto isoletttrico mediante isoelettrofocalizzazione analitica su gel di poliacrilammide utilizzando un intervallo di pH compreso tra 2,8 e 6,6 ottenuto miscelando anfoliti della BDH (Resolyte 2-5 e Resolyte 3,0-6,5)

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

L'originalità di questo lavoro finalizzato alla valorizzazione delle acque di vegetazione delle olive (AV) per la produzione microbica di lipasi risiede nell'aver valutato le prestazioni produttive e degradative dei ceppi fungini in questione su acque di vegetazione che presentavano composizione e origine diversificate. Questa impostazione sperimentale ha tenuto, infatti, conto delle ampie oscillazioni di composizione del refluo che sono ascrivibili ad una serie di fattori, quali efficienza del separatore centrifugo (decanter), volumi di acqua apportati durante la fase di gramolatura, condizioni metereologiche (siccatà, clima più o meno freddo, ecc.), varietà delle olive e loro grado di maturazione, etc. (Montedoro, 1986).

I parametri chiave che possono influenzare le prestazioni di un processo microbico sono in particolare il carico organico iniziale, la concentrazione dei fenoli totali e quella degli zuccheri totali.

Diversi lavori in letteratura segnalano, infatti, che alcuni processi microbici condotti su effluenti di varia natura sono possibili solo al di sotto di certi valori critici di carico organico. Anche la concentrazione dei fenoli, la cui attività biostatica è ampiamente documentata nella letteratura scientifica, può risultare un fattore chiave (Capasso et al., 1995). La concentrazione degli zuccheri totali, infine, può influenzare direttamente i processi microbici, favorendo la crescita, inducendo o reprimendo attività enzimatiche e produzioni di metaboliti (Petrucchioli et al., 1988; Demicheli & Bontoux, 1996; Lopez et al., 1997; Dalmau et al., 2000; Muralidhar et al., 2001).

Un altro aspetto innovativo di questo studio è che le AV rappresentano un valido terreno liquido di crescita per la produzione di lipasi microbiche. Sebbene sono, ad oggi, disponibili diversi processi fermentativi per la produzione di lipasi e protocolli efficienti per l'espressione eterologa dell'enzima (Ferrer et al., 2001; Dominguez de Maria, 2006), c'è un crescente interesse per la ricerca di substrati grezzi economici che renderebbero il processo industriale di produzione di enzimi per via fermentativa competitivo rispetto ai processi chimici attualmente in uso (Miranda et al., 1999). Molto spesso è la fonte di carbonio che influenza in maniera significativa il costo del prodotto finale di un bioprocesso (Arbige & Pitcher, 1989; Ramalingam & Pennathur, 2005). In questa ottica, è stata presa in esame la possibilità di utilizzare vari sottoprodotti industriali che hanno permesso di ottenere quantità significative di lipasi (Cordova et al., 1998; Azab, 2000).

Inizialmente, durante questa tesi di dottorato, è stato condotto uno screening con diversi ceppi fungini, finalizzato ad individuare i microrganismi in grado di crescere su acque reflue di frantoi oleari e di produrre lipasi extracellulari. Successivamente, sono stati selezionati alcuni ceppi migliori produttori ed è stato fatto uno studio preliminare per definire alcune condizioni colturali (tipo di olio e di fonte azotata inorganica) per la loro crescita e per la produzione enzimatica. Sebbene tutti i ceppi indagati in questo studio sono stati capaci di crescere su un terreno a base di AV, produrre livelli significativi di attività lipolitica, *Candida cylindracea* NRRL Y-17506 e *Penicillium citrinum* NRRL 1841 si sono dimostrati particolarmente interessanti. Sulla base dei risultati preliminari, si è inteso valutare più approfonditamente l'idoneità di questi ceppi per gli scopi sopra menzionati. In particolare, l'obiettivo principale è stato quello di ottimizzare il terreno di crescita a base di acque di vegetazione e le condizioni colturali sia in beuta che in bioreattore da banco.

4.1 MESSA A PUNTO DEL DOSAGGIO DELL'ATTIVITA' LIPOLITICA

Uno dei primi problemi che ci si è posti nel corso dell'attività sperimentale è stata l'individuazione e la successiva messa a punto di un protocollo di dosaggio dell'attività lipasica che rispondesse ad una serie di requisiti tenendo conto del fatto che gli estratti soggetti al dosaggio non sarebbero stati terreni sintetici.

I requisiti individuati sono stati:

1. affidabilità del metodo tenendo presente che le acque di vegetazione sono ricche di sostanze cromofore che possono interferire con metodiche spettrofotometriche e/o turbidimetriche di dosaggio;
2. una sufficiente sensibilità tale da consentire di seguire l'andamento della produzione sin dalle prime fasi colturali;
3. una compatibilità del metodo con la manipolazione contemporanea di un numero elevato di campioni resa necessaria dal fatto che i ceppi sottoposti al saggio e le varianti sperimentali con relative repliche sono state non inferiori a 24 campioni per ogni prelievo;
4. la scelta di un substrato in grado di dosare solo attività lipolitiche tenendo conto che molti dei ceppi microbici impiegati possono essere dei buoni produttori di esterasi;
5. la scelta di una metodica in cinetica utile a valutare con precisione la velocità iniziale di reazione.

Una delle metodiche spettrofotometriche più universalmente impiegate è basata sull'impiego di *para*-nitrofenilderivati e sulla determinazione del *para*-nitrofenolo liberato, il cui coefficiente di estinzione viene enfatizzato dall'aggiunta di un reagente alcalino che porta alla formazione di *para*-nitrofenato che presenta un massimo di assorbimento nella zona compresa tra 400 e 415 nm. Tra questi derivati, è stato selezionato il *para*-nitrofenil-laurato (C₁₂), il quale consente, in virtù della presenza di una catena acilica a 12 atomi di carbonio, di dosare solo enzimi ad attività lipasica e quindi risponde pienamente al requisito (4). Inoltre, l'uso di tale substrato si presta egregiamente ad un dosaggio in cinetica e quindi soddisfa il requisito (5) (Helistö & Korpela, 1998). Sfortunatamente, prove preliminari condotte con estratti ad attività lipasica nota (lipasi da *Candida rugosa*) in presenza di volumi crescenti di acque di vegetazione trattate al calore hanno mostrato delle fortissime interferenze rispetto ai controlli. Tali interferenze, dovute alla presenza di cromofori nell'effluente che assorbono alla stessa lunghezza d'onda del prodotto di reazione, non sono state rimosse nemmeno sottoponendo i campioni di acque a dialifiltrazione (cut-off 10000) nè a chiarificazione con polivinilpolipirrolidone (PVPP) o polietileneimmina. Per questa ragione, tale metodica di dosaggio è stata abbandonata.

L'approccio titrimetrico, fondato sulla titolazione dei gruppi acidi liberati in seguito all'idrolisi di triacilgliceroli (Parry et al., 1966) non si è rivelata rispondente alle esigenze sperimentali in quanto tale metodo opera su volumi non inferiori a 10 ml; ha un limite di sensibilità pari a 0,1 Unità Internazionali di enzima e richiede molte accortezze per evitare variazioni di pH che nulla hanno a che vedere con l'idrolisi e la successiva liberazione di gruppi acidi. Per queste ragioni, tale metodica non soddisfa i requisiti (2), (3) e (5).

E' stato provato un altro approccio basato sulla determinazione spettrofotometrica degli acidi grassi liberati dall'attività lipasica mediante l'impiego di una soluzione al 5% di acetato rameico pentaidrato portata a pH 6,0 con piridina. Tale metodica prevede un'estrazione della miscela di reazione con isoottano, un prelievo della fase organica, una successiva incubazione con la soluzione di sviluppo contenente rame e lettura spettrofotometrica della fase organica a 715 nm (Kwon & Rhee, 1986). Tale metodica si è rivelata estremamente sensibile (2 µg di acido oleico) e riproducibile operando su soluzioni standard di acidi grassi in isoottano. Sfortunatamente, la fase estrattiva successiva alle reazioni enzimatiche condotte in presenza di acque di vegetazione ha mostrato una bassa resa come evidenziato aggiungendo concentrazioni note di acidi

grassi. Tale bassa efficienza ha richiesto almeno 4 estrazioni sequenziali della miscela di reazione e una successiva evaporazione della fase organica. La laboriosità del metodo non si è rivelata, quindi, compatibile con la manipolazione di un numero elevato di campioni.

L'impiego, invece, di naftilderivati (Versaw et al., 1989), ed in particolare del β -naftilmiristato (BNM), si è rivelato adatto allo scopo in quanto tale metodica è risultata molto sensibile (0,004 UI); la reazione può essere rapidamente interrotta dall'aggiunta di acido tricloroacetico senza determinare interferenze di alcuna natura; è, inoltre, possibile seguire visivamente l'estrazione del prodotto di accoppiamento tra il β -naftolo e il sale di diazonio Fast Blue BB. Infine, i composti colorati presenti nelle acque non sono stati co-estratti con il prodotto di reazione.

Per tutte queste ragioni, è stata selezionata quest'ultima metodica che è stata, quindi, utilizzata per tutta la sperimentazione.

4.2 SELEZIONE DI CEPPI FUNGINI PRODUTTORI DI LIPASI SU ACQUE DI VEGETAZIONE (AV)

La produzione di lipasi è particolarmente diffusa nel mondo microbico (Macrae, 1983); esiste infatti molta letteratura sull'argomento sia relativamente alla produzione da batteri (Rúa et al., 1997; Schuepp et al., 1997; Morkbak et al., 1999; Sharma et al., 2002) che, e soprattutto, da funghi (Rivera-Munoz et al., 1991; Rapp & Backhaus, 1992; Metwally et al., 1995), cresciuti su substrati sintetici. Al contrario, esistono solo pochi lavori relativi alla produzione di lipasi microbiche a partire da residui e sottoprodotti del sistema agro-alimentare (Abdel-Mohsen, 1996; Kamini et al., 1998; Miranda et al., 1999; Azab 2000), e nessuno, a nostra conoscenza, che utilizzi come substrato fermentativo i reflui dell'industria olearia.

Di conseguenza, la scelta dei ceppi microbici da sottoporre a screening è stata basata sui seguenti criteri:

- utilizzare ceppi già descritti in letteratura come buoni produttori di lipasi su terreni colturali ottimizzati;
- utilizzare ceppi isolati da AV o da ambienti contaminati dal refluo oleario.

A tal fine sono stati richiesti ed ottenuti dalla ARS Culture Collection (NRRL) 10 ceppi fungini dei quali 3 (*Geotrichum candidum* NRRL Y-552, *G. candidum* NRRL Y-553 e *Rhizopus arrhizus* NRRL 2286) già descritti come ceppi produttori di lipasi

(Baillargeon et al., 1989; Elibol & Ozer, 2000) e i restanti 7 ceppi (Tabella 4.1) appartenenti a specie già note come produttrici di tali enzimi (Robert et al., 1989; Sztajer et al., 1989; Shaw et al., 1989; Pokorny et al., 1994; Macris et al., 1996; Kamini et al., 1998; Miranda et al., 1999). Due ceppi fungini (*Penicillium citrinum* ISRIM 118 e *Rhizopus* sp. ISRIM 383) sono stati poi ottenuti dalla ISRIM (Par. 3.1.2.) come isolati da suoli durante prove di fitodepurazione delle AV.

Lo screening per l'attività lipasica è stato condotto utilizzando AV1 (Tabella 3.1-3.2) caratterizzate da un carico inquinante (COD e fenoli totali) non particolarmente elevato e, comunque, nella media rispetto a quello delle AV dei frantoi della zona. Alle AV non è stato aggiunto alcun potenziale induttore (ad es. oli) di attività lipasica considerando che un certo residuo in olio è naturalmente presente nelle AV e che obiettivo dello screening è stato quello di mettere in evidenza, possibilmente, ceppi ad attività costitutiva.

In Tabella 4.1 è riportata la biomassa microbica e l'attività lipolitica di ciascuno dei ceppi saggiati. Tutti i ceppi sono cresciuti sufficientemente sulle AV: i ceppi di *Aspergillus* e *Penicillium* meglio rispetto agli altri. Anche l'attività lipolitica è stata rilevata per tutti i ceppi, raggiungendo, tuttavia, livelli in alcuni casi molto inferiori rispetto a quelli riportati in letteratura per i ceppi già noti su terreni sintetici (Sztajer et al., 1989; Jacobsen et al., 1990; Pimentel et al., 1994; Miranda et al., 1999) e comunque in un intervallo piuttosto ristretto (fra 0,30 e 0,52 U/ml). Degne di nota sono comunque le produzioni di *G. candidum* NRRL Y-553 (0,52 U/ml), *Candida cylindracea* NRRL Y-17506 (0,46 U/ml) e quelle osservate nei tre ceppi di *P. citrinum* perché ottenute con tempi di fermentazione ridotti. Anche per quanto riguarda la capacità di abbattimento della componente organica (COD, zuccheri totali e fenoli totali) delle AV (Tabella 4.2.), non sono stati osservati comportamenti particolarmente diversi fra i ceppi. Tuttavia, risulta abbastanza evidente come i ceppi di *Rhizopus* abbiano mediamente utilizzato la componente organica del refluo in misura minore rispetto agli altri.

Sulla base dei risultati ottenuti che non evidenziano valori di spicco e tenendo conto della preliminarità della prova di screening, non è stato possibile selezionare per il prosieguo del lavoro un solo ceppo. Da una valutazione complessiva che ha preso in considerazione sia i livelli di produzione enzimatica raggiunti dai singoli ceppi che la loro abilità ad utilizzare la componente organica del refluo (capacità degradativa), si è quindi deciso di proseguire la ricerca utilizzando i ceppi più promettenti: *C. cylindracea* e *G. candidum* perché hanno raggiunto i livelli più elevati di attività lipasica con buone

capacità degradative e i tre ceppi di *P. citrinum* per i brevi tempi di fermentazione.

Tabella 4.1 Crescita ed attività lipasica di ceppi fungini selezionati cresciuti su acque di vegetazione (AV 1) *

Ceppo	T _{max} # (ore)	Lipasi ¥ (U/ml)	Biomassa (g/l)	Attività specifica § (U/g)	pH
<i>Penicillium citrinum</i> NRRL 1841	72	0,37±0,02 ^{ab}	5,88±0,02	62,07	5,55±0,01
<i>Penicillium citrinum</i> NRRL 3754	120	0,34±0,04 ^{ab}	5,34±0,01	62,73	7,69±0,01
<i>Penicillium citrinum</i> ISRIM 118	72	0,38±0,07 ^{ab}	5,71±0,18	65,67	7,54±0,06
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 334	168	0,33±0,01 ^{ab}	7,07±0,63	46,39	4,19±0,30
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 485	168	0,38±0,02 ^{ab}	5,39±0,42	69,57	5,56±0,04
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 1988	168	0,34±0,03 ^{ab}	5,73±0,18	59,69	6,74±0,13
<i>Candida cylindracea</i> NRRL Y-17506	168	0,46±0,01 ^{ac}	3,65±0,07	125,75	8,05±0,13
<i>Geotrichum candidum</i> NRRL Y-552	96	0,36±0,07 ^{ab}	4,06±0,23	88,18	7,16±0,01
<i>Geotrichum candidum</i> NRRL Y-553	168	0,52±0,01 ^c	3,16±0,05	164,87	7,26±0,02
<i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 2286	168	0,30±0,02 ^{bd}	3,07±0,15	96,09	5,22±0,12
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 6431	120	0,36±0,05 ^{acd}	3,27±0,15	118,96	5,13±0,01
<i>Rhizopus</i> sp. ISRIM 383	120	0,35±0,03 ^{ab}	4,22±0,16	83,18	7,58±0,01

* I valori, riportati come media±deviazione standard, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica. Biomassa e pH sono riferiti alla 168^a ora.

¥ I valori seguiti dallo stesso esponente non sono significativamente differenti, secondo il Tukey Test (p<0,01).

Tempo di fermentazione corrispondente al momento di massima produzione enzimatica.

§ Attività lipasica per grammo di biomassa microbica.

Tabella 4.2 Abbattimento della componente organica da parte di ceppi fungini selezionati cresciuti su acque di vegetazione (AV1) *

Ceppo	COD (g/l)	Zuccheri totali (g/l)	Fenoli totali (g/l)
<i>Penicillium citrinum</i> NRRL 1841	30,41±3,63 (20,1)#	8,90±0,28 (41,4)	2,80±0,01 (22,2)
<i>Penicillium citrinum</i> NRRL 3754	23,27±2,85 (38,9)	7,25±0,07 (52,3)	2,43±0,04 (32,5)
<i>Penicillium citrinum</i> ISIRIM 118	27,85±1,03 (26,8)	8,35±0,64 (45,1)	3,11±0,04 (13,6)
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 334	28,48±3,58 (32,2)	6,77±1,18 (66,8)	3,01±0,01 (17,3)
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 485	32,68±0,92 (22,4)	6,77±0,42 (66,8)	3,29±0,04 (9,7)
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 1988	29,54±2,08 (29,8)	7,35±1,63 (63,9)	2,55±0,045 (29,9)
<i>Candida cylindracea</i> NRRL Y-17506	30,35±1,27 (27,8)	8,85±0,08 (56,6)	2,65±0,59 (27,2)
<i>Geotrichum candidum</i> NRRL Y-552	28,58±3,11 (25)	7,50±0,57 (50,7)	2,84±0,44 (21,1)
<i>Geotrichum candidum</i> NRRL Y-553	28,31±3,81 (32,6)	7,65±1,34 (62,5)	2,53±0,08 (30,5)
<i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 2286	32,74±3,03 (22,1)	10,03±0,99 (50,8)	3,54±0,05 (2,8)
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 6431	33,72±0,55 (11,3)	9,80±0,29 (35,5)	3,28±0,01 (8,9)
<i>Rhizopus sp.</i> ISIRIM 383	31,95±3,52 (16,1)	9,03±0,14 (40,8)	2,54±0,05 (29,7)

* I valori, riportati come media±deviazione standard, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica.

In parentesi sono riportati i valori percentuali (%) di abbattimento rispetto al t₀.

4.3 EFFETTO DI DIVERSE TIPOLOGIE DI AV SULLA PRODUZIONE DI LIPASI

Come già accennato le AV hanno una composizione variabile dipendente da fattori colturali, stagionali, dalla tecnologia di estrazione, ecc. Questo aspetto può rappresentare a sua volta un fattore di variabilità significativo per tutti i processi microbici che utilizzano le AV come substrato di crescita e produzione. Per quanto riguarda la produzione di lipasi, è noto che la concentrazione ed il tipo di zuccheri presenti nel mezzo di produzione possono avere un peso determinante e, comunque, una risposta non univoca. *Candida rugosa* (Dalmau et al., 2000) non produce lipasi in presenza di zuccheri semplici, mentre *G. candidum* inizia a sintetizzare lipasi solo dopo completa utilizzazione del glucosio nel mezzo colturale (Macrae, 1983); anche per *Candida parailipolytica* ed *Aspergillus terreus* è stato descritto un comportamento simile (Sugiura & Isobe, 1975; Macris et al., 1996). Al contrario, le produzioni da ceppi appartenenti a varie specie di *Rhizopus* non sono particolarmente influenzate dal tipo di fonte di carbonio e le produzioni sono ottenute anche su glucosio (Espinosa et al., 1990; Elibol & Ozer, 2000).

E' sembrato quindi interessante indagare quanto la concentrazione in zuccheri totali delle AV potesse influire sulla produzione lipolitica dei 5 ceppi da noi selezionati in fase di screening. A tale scopo sono state utilizzate 4 diverse AV (Tabella 3.1-3.2) caratterizzate da diversa concentrazione in zuccheri totali (da 8,8 a 25,07 g/l). Per minimizzare un possibile effetto combinato, concentrazione di zuccheri e COD, fra i campioni di reflui oleari prelevati nei frantoi della zona, sono state scelte AV che, oltre ad avere una diversa concentrazione di zuccheri, avessero un carico organico (COD) non proporzionale alla corrispondente frazione zuccherina; le AV utilizzate avevano, quindi, un rapporto "COD/zuccheri totali" variabile fra 2,05 e 3,13.

Il grafico di Figura 4.1 mostra i valori di attività lipasica e le relative attività specifiche (U/g di biomassa), riferite al momento di massima produzione enzimatica, da parte dei 5 ceppi selezionati al variare del rapporto COD/zuccheri. Il comportamento dei tre ceppi di *P. citrinum* al variare del rapporto è risultato piuttosto omogeneo e comunque il tipo di AV non sembrava avere un effetto marcato. Anche nel caso di *G. candidum* l'utilizzazione di AV con diverso rapporto COD/zuccheri non ha influenzato in modo particolarmente marcato la produzione enzimatica. Al contrario, la produzione di lipasi da *C. cylindracea* è stata influenzata significativamente dal tipo di AV utilizzate: in particolare, in corrispondenza di elevati rapporti COD/zuccheri (2,90 e 3,13)

corrispondenti ai livelli più bassi in zuccheri totali (8,8 e 13,2 g/l, rispettivamente) sono state osservate le attività enzimatiche più elevate (0,94 e 0,82 U/ml, rispettivamente). I risultati ottenuti sembrano, quindi, indicare che se da un verso l'attività enzimatica del ceppo di lievito può dipendere, nel bene o nel male, dal tipo di AV, dall'altro esistono margini per migliorare la produzione enzimatica.

La crescita microbica dei 5 ceppi saggiati è stata influenzata in modo piuttosto marcato dalla tipologia di AV: anche in questo caso i 3 ceppi di *P. citrinum* hanno avuto un comportamento simile fra di loro ma diverso da quello degli altri due ceppi (Figura 4.2). E' stato anche valutato l'effetto del tipo di AV sulla capacità degradativa (concentrazioni residue e percentuali di riduzione) della componente organica (COD, zuccheri totali e fenoli totali) da parte dei ceppi studiati (Figura 4.3-4.5). Al contrario di quanto ci si poteva aspettare, in corrispondenza dei valori più elevati di COD iniziale, non si è avuta minore percentuale di abbattimento (Figura 4.3); questo, probabilmente, stava ad indicare che buona parte della componente organica del refluo era costituita da sostanze utilizzabili dal microrganismo. Comportamento simile è stato osservato per i tre *Penicillium* anche per la capacità di abbattimento dei fenoli totali (Figura 4.5). *G. candidum* e *C. cylindracea*, invece, hanno risentito maggiormente dei livelli più alti di fenoli totali (AV2): le percentuali di riduzione sono state, infatti, solo del 9,0 e 11,2%, rispettivamente.

La sperimentazione su diverse tipologie di AV ci ha permesso di fare una ulteriore selezione dei ceppi da poter portare avanti nel presente lavoro di tesi: *G. candidum* e *C. cylindracea* ci sono sembrati senza dubbio interessanti dal punto di vista delle produzioni di lipasi, e quindi degni di ulteriori approfondimenti. Per quanto riguarda i tre *Penicillium*, considerando le non significative differenze per quanto riguarda l'attività enzimatica, si è preso in considerazione quello che meglio ha mostrato una buona capacità nell'abbattimento dei fenoli totali, il ceppo NRRL 1841.

4.5 EFFETTO DELLA FONTE AZOTATA SULLA PRODUZIONE DI LIPASI

L'effetto della fonte azotata è stato spesso analizzato negli studi di messa a punto del terreno colturale per la produzione di lipasi (Pokorny et al., 1994; Pimentel et al., 1996; Kamini et al., 1998). E' noto infatti che sia il tipo di fonte azotata che la sua

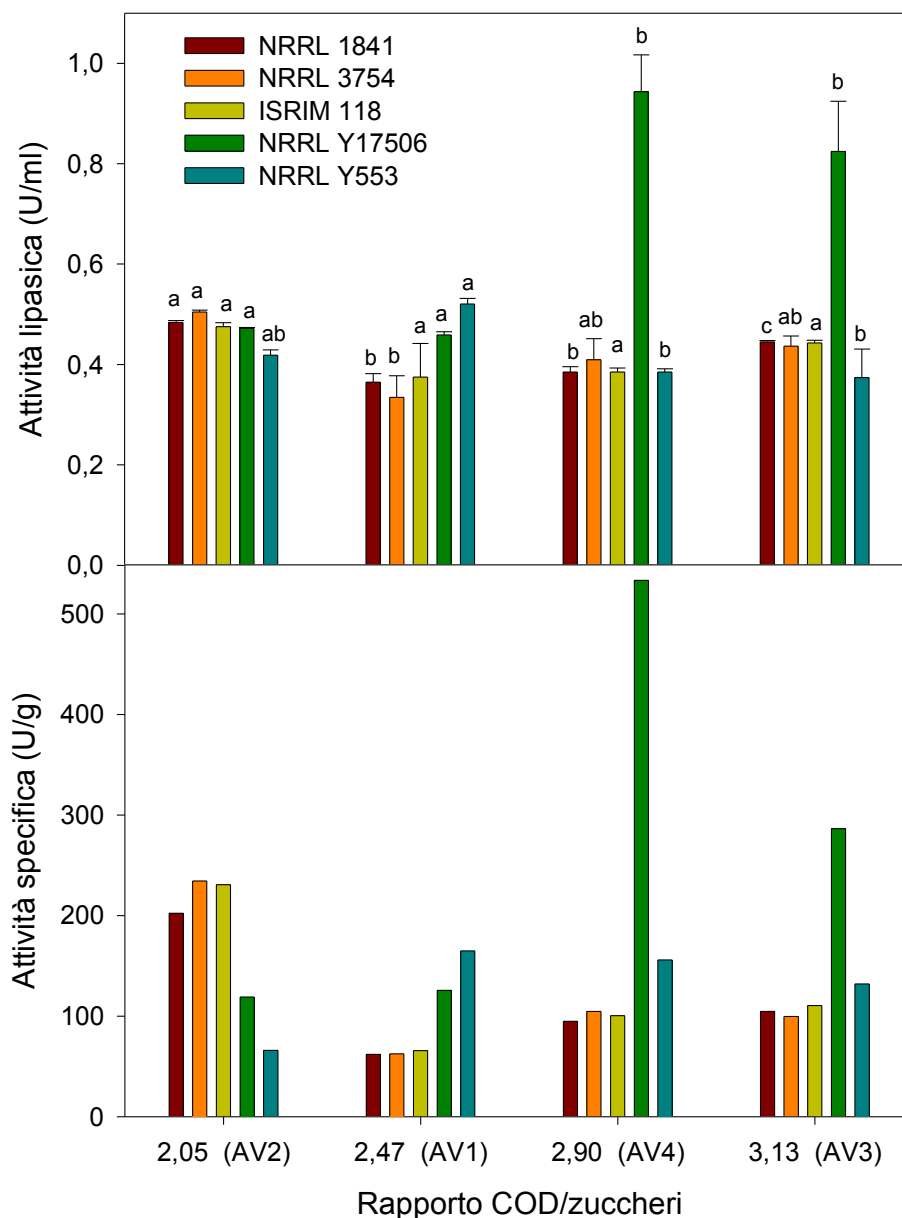


Figura 4.1 Effetto del rapporto COD/zuccheri di diverse acque di vegetazione delle olive sulla produzione di lipasi e attività lipasica specifica (U/g di biomassa) da *P. citrinum* NRRL 1841, NRRL 3754, ISRIM 118, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono al momento di massima attività lipasica. Nell'ambito di uno stesso ceppo fungino, lettere uguali riportate al di sopra di ciascuna colonna, indicano differenze non statisticamente significative, secondo il Tukey test ($P < 0,01$).

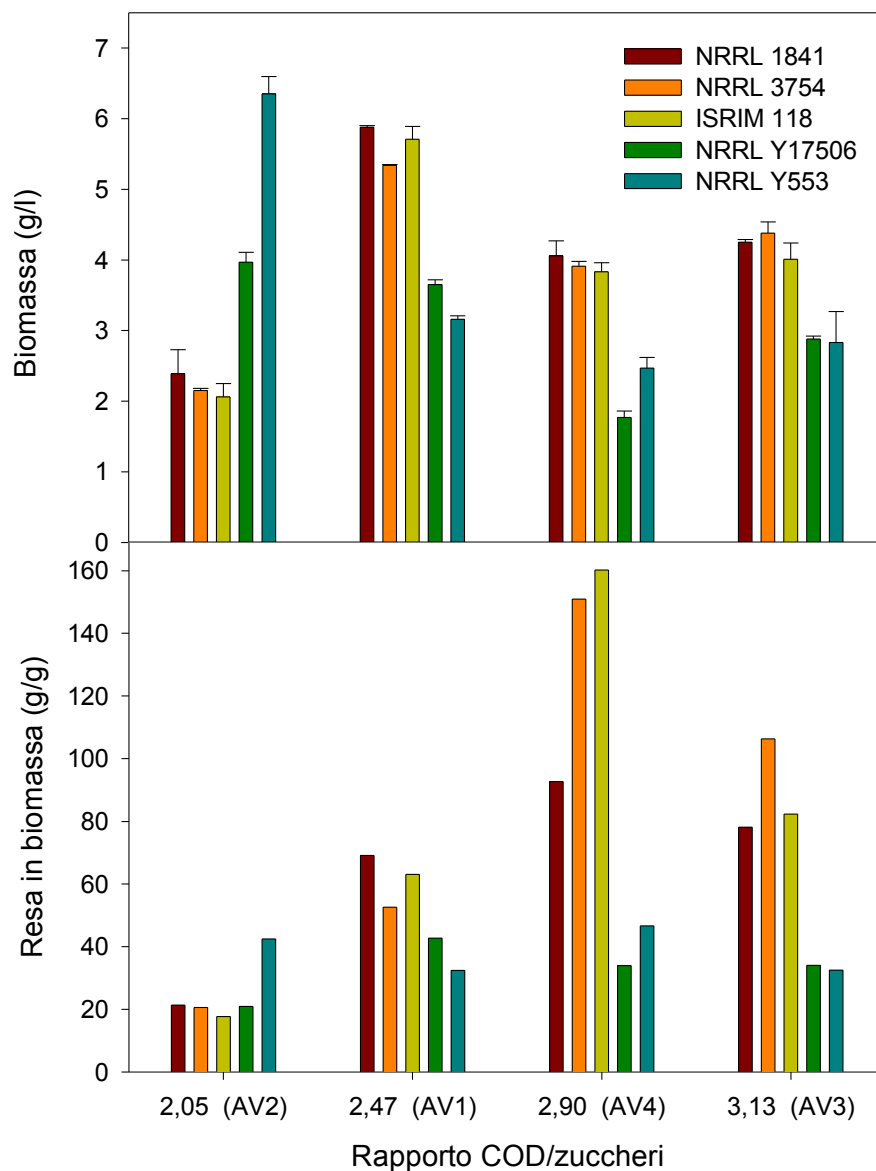


Figura 4.2 Effetto del rapporto COD/zuccheri di diverse acque di vegetazione delle olive sulla biomassa formata e resa rispetto agli zuccheri totali consumati da *P. citrinum* NRRL 1841, NRRL 3754, ISRIM 118, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono alla fine della fermentazione (168^a ora).

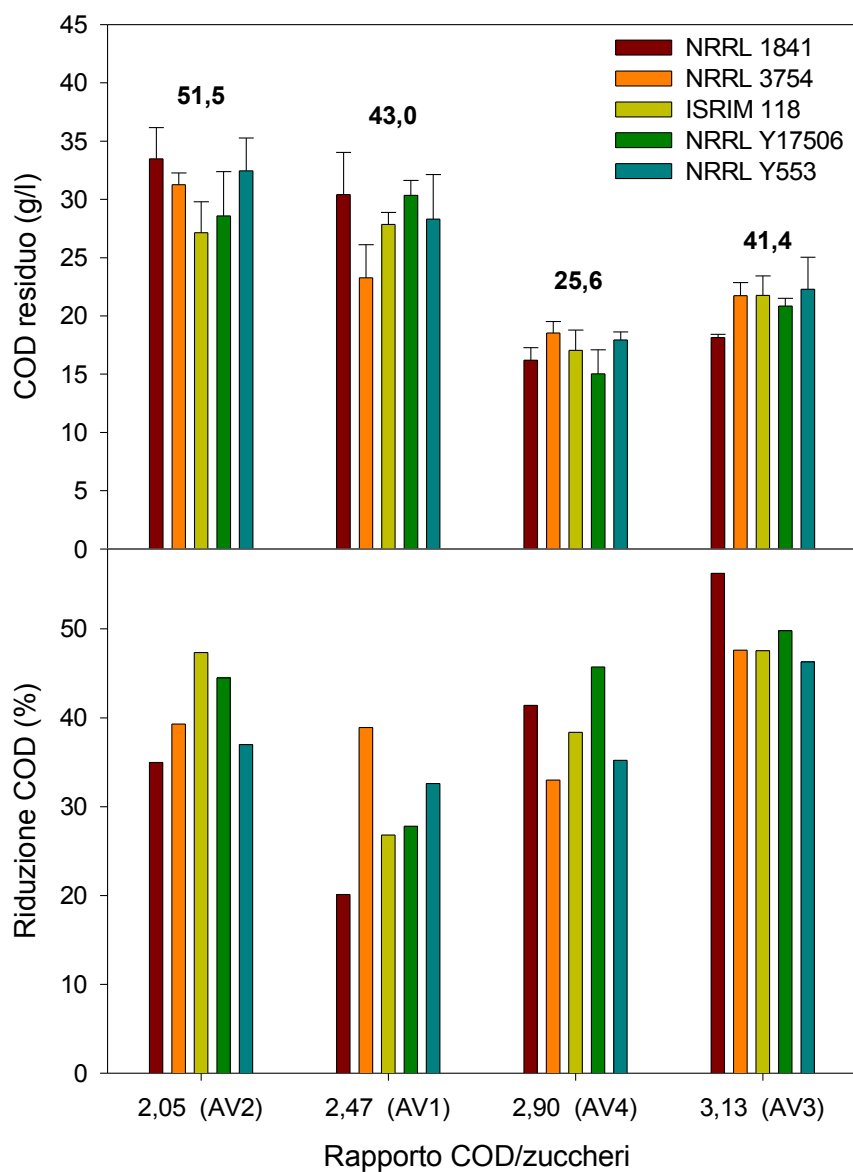


Figura 4.3 Effetto del rapporto COD/zuccheri di diverse acque di vegetazione delle olive sulla riduzione del COD da *P. citrinum* NRRL 1841, NRRL 3754, ISRIM 118, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono al momento di massima attività lipasica. Al di sopra di ciascun gruppo di istogrammi sono riportati i valori iniziali di COD.

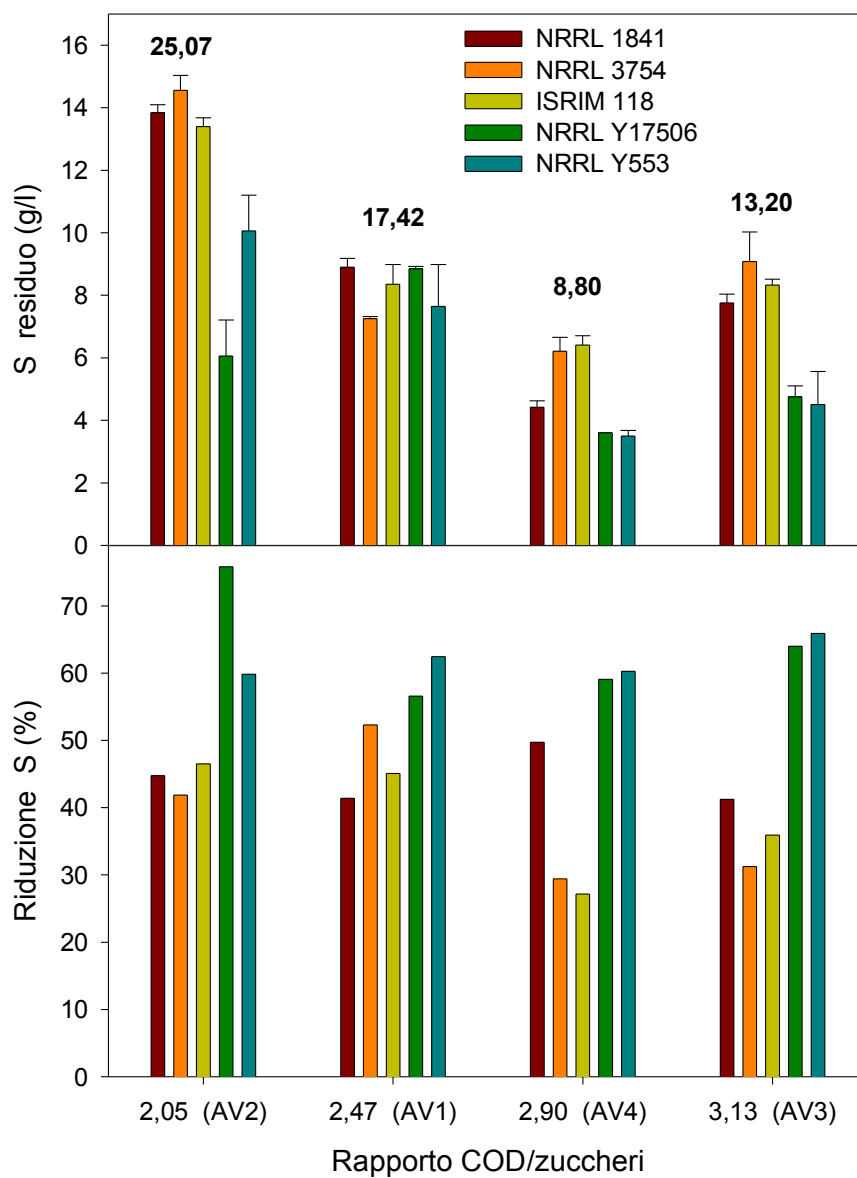


Figura 4.4 Effetto del rapporto COD/zuccheri di diverse acque di vegetazione delle olive sul consumo di zuccheri totali (S) da *P. citrinum* NRRL 1841, NRRL 3754, ISRIM 118, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono al momento di massima attività lipasica. Al di sopra di ciascun gruppo di istogrammi sono riportati i valori iniziali degli zuccheri totali.

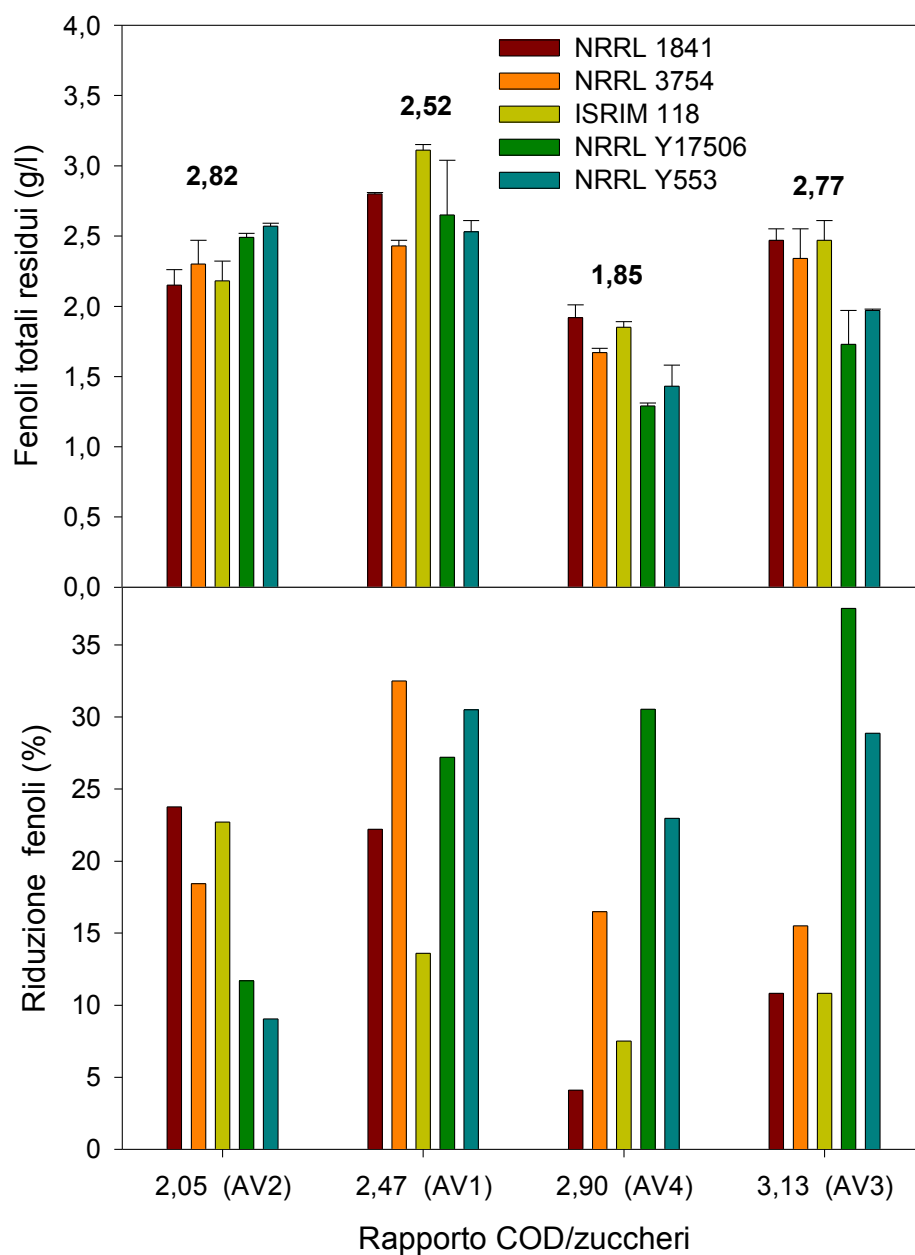


Figura 4.5 Effetto del rapporto COD/zuccheri di diverse acque di vegetazione delle olive sulla riduzione dei fenoli totali da *P. citrinum* NRRL 1841, NRRL 3754, ISRIM 118, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono al momento di massima attività lipasica. Al di sopra di ciascun gruppo di istogrammi sono riportati i valori iniziali dei fenoli totali.

concentrazione possano influire sulla produzione di tale enzima (Christakopoulos et al., 1992; Papaparaskevas et al., 1992; Miranda et al., 1999; Tan et al., 2004).

Nel nostro caso sono state messe a confronto quattro differenti fonti azotate, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 e urea, ad una concentrazione calcolata in modo da fornire in ciascun caso la stessa quantità di azoto (0,63 g/l); per valutare l'effetto della fonte azotata sono state utilizzate le AV4 (Tabella 3.1-3.2). I risultati, riferiti alla produzione di lipasi e alla crescita, sono mostrati nei grafici di Figura 4.6 e 4.7, rispettivamente.

La produzione enzimatica da *C. cylindracea* è stata notevolmente favorita da entrambe le fonti ammoniacali, raggiungendo valori ($1,24 \pm 0,15$ U/ml per il solfato d'ammonio e $1,45 \pm 0,14$ U/ml per il cloruro d'ammonio) più che doppi rispetto a quelli ottenuti con la fonte nitrica e l'urea ($0,34 \pm 0,02$ U/ml e $0,69 \pm 0,10$ U/ml rispettivamente). Questi risultati sono in netto contrasto con quanto riportato per la produzione di lipasi da ceppi del genere *Candida*: vari autori negli studi di ottimizzazione della produzione di lipasi da *C. rugosa* (Valero et al., 1988; Obradors et al., 1993; Benjamin & Pandey, 1996) e *Y. lipolytica* (Corzo & Revah, 1999), infatti, hanno utilizzato urea come fonte azotata nei terreni colturali.

Le produzioni di lipasi da *P. citrinum* e *G. candidum* sono state influenzate significativamente dalla fonte azotata ($p < 0,01$); tuttavia, le differenze tra i valori medi di produzione ottenuti al variare delle fonti azotate non sono state di entità paragonabile a quelle osservate nel caso di *C. cylindracea*. Anche per questi due ceppi, l'urea è risultata la fonte meno idonea. Il cloruro di ammonio, per il *Penicillium*, è risultato essere la fonte azotata preferita. Ciò trova riscontro con quanto riportato da Miranda et al. (1999), i quali misero a confronto tre diverse fonti azotate [NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e urea] ottenendo produzioni più elevate con il cloruro d'ammonio e di gran lunga più basse con l'urea.

Per quanto riguarda la crescita, i tre microrganismi non sembrano avere una particolare preferenza per una delle quattro fonti azotate messe a confronto.

Dall'analisi dei grafici di Figura 4.8-4.10 si possono trarre alcune generali conclusioni relative all'abbattimento del carico organico da parte dei tre ceppi. La natura della sorgente azotata ha influenzato notevolmente l'entità della riduzione del carico organico in colture liquide di *P. citrinum* e *C. cylindracea*; in particolare, il cloruro ammonico nel caso del *P. citrinum* e l'urea per *C. cylindracea* ha supportato in maniera ottimale la riduzione del COD (Figura 4.8).

Dal grafico di Figura 4.10 si evidenzia l'elevata riduzione dei fenoli totali da parte di *P. citrinum* in presenza di tutte le fonti azotate, con un valore massimo di riduzione pari al 78,2% in presenza di solfato ammonico.

G. candidum e *C. cylindracea*, invece, si sono rivelati molto meno efficienti nel ridurre la concentrazione fenolica del refluo con valori di riduzione compresi tra il 28 e il 53%. Per entrambi i ceppi, l'urea è risultata essere la sorgente azotata più idonea a sostenere la degradazione.

4.6 EFFETTO DELL'AGGIUNTA DI OLIO SULLA PRODUZIONE DI LIPASI

La produzione di lipasi può essere influenzata da molti fattori, ma quello che, almeno in teoria, può giocare un ruolo chiave nella sintesi di tale enzima è la presenza o meno di potenziali induttori e/o substrati. E' noto che la produzione di lipasi microbica può essere costitutiva o inducibile (Macrae, 1983). Per attività lipasiche non costitutive la presenza di un induttore è un fattore determinante (Baillargeon et al., 1989; Pimentel et al., 1996; Pokorny et al., 1997); alcuni autori hanno utilizzato oli in quantità tali da rappresentare sia la fonte di carbonio che l'induttore (Valero et al., 1988; Benjamin & Pandey, 1996; Corzo & Revah, 1999), mentre altri hanno studiato l'effetto di aggiunte di oli a basse concentrazioni come elemento induttore, in terreni colturali che contenevano fonti di carbonio diverse (Hegedus & Khachatourians, 1988). Rari sono, tuttavia, i casi in cui per attività costitutive è stato messo a punto un terreno colturale con monosaccaridi o polisaccaridi (Samad et al., 1990; Abdel-Mohsen, 1996; Elibol & Ozer, 2000), rispetto ai casi in cui la produzione, seppur costitutiva, veniva incrementata da lipidi (Espinosa et al., 1990; Christakopoulos et al., 1992). Vari autori, infine, hanno anche valutato l'effetto della fonte lipidica sulla produzione enzimatica, utilizzando, ad esempio, olio d'oliva, di mais, di soia, di palma e Tween 80 (Papaparaskevas et al., 1992; Pimentel et al., 1996; Pimentel et al., 1997; Abbas et al., 2002).

Nel nostro caso l'effetto dell'aggiunta di oli sulla produzione di lipasi è stato studiato fornendo olio di oliva, di mais o di soia a basse concentrazioni (3 g/l), valutandone così una possibile azione come fattore inducente visto anche che nelle AV ci sono altri composti ad alte concentrazioni che rappresentano la fonte di carbonio primaria. I tre casi sono stati inoltre confrontati con una tesi in cui non è stato aggiunto olio.

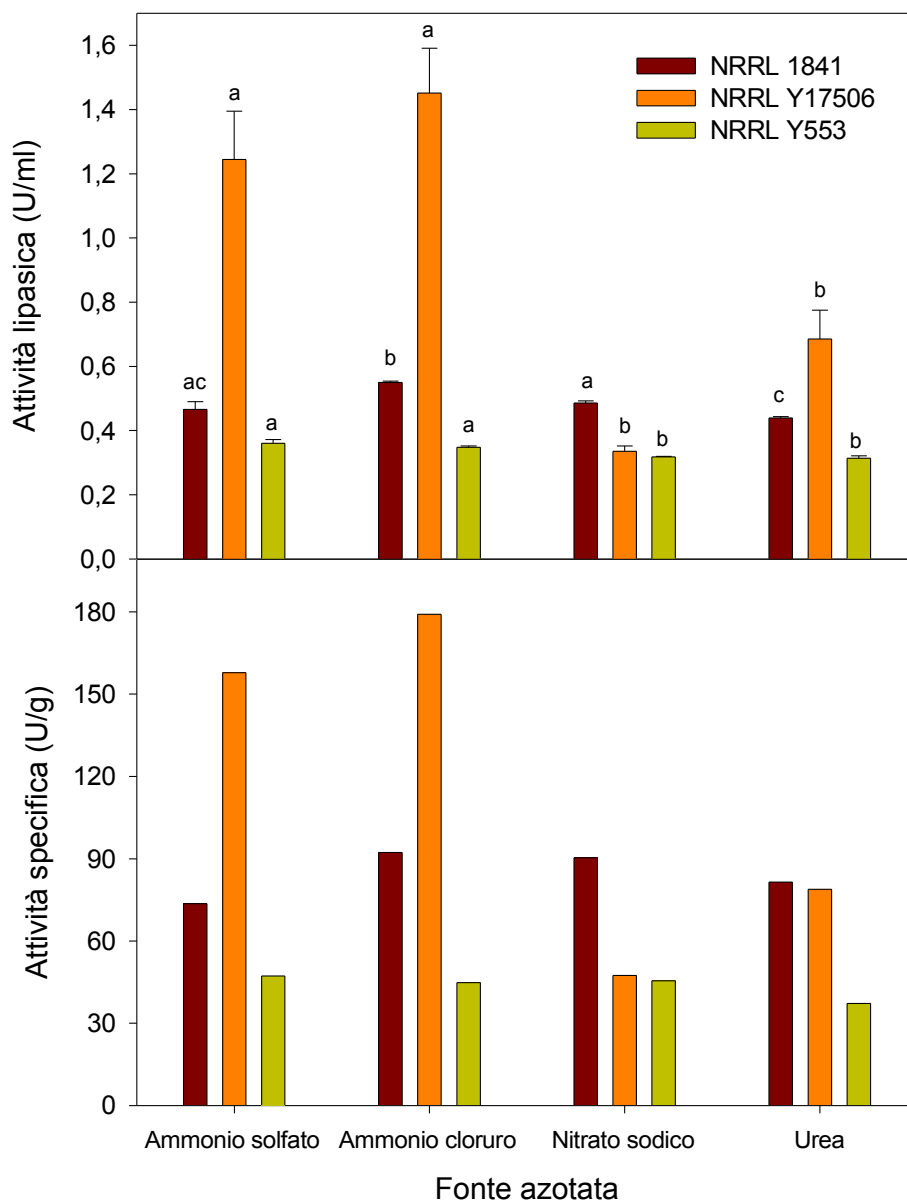


Figura 4.6 Effetto della fonte azotata aggiunta ad acque di vegetazione (AV4) sulla produzione di lipasi e attività lipasica specifica (U/g di biomassa) da *P. citrinum* NRRL 1841, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono al momento di massima attività lipasica. Nell'ambito di uno stesso ceppo fungino, lettere uguali riportate al di sopra di ciascuna colonna, indicano differenze non statisticamente significative, secondo il Tukey test ($P < 0,01$).

Figura 4.7 Effetto della fonte azotata aggiunta ad acque di vegetazione (AV4) sulla biomassa formata e resa rispetto agli zuccheri totali consumati da *P. citrinum* NRRL 1841, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono alla fine della fermentazione (168^a ora).

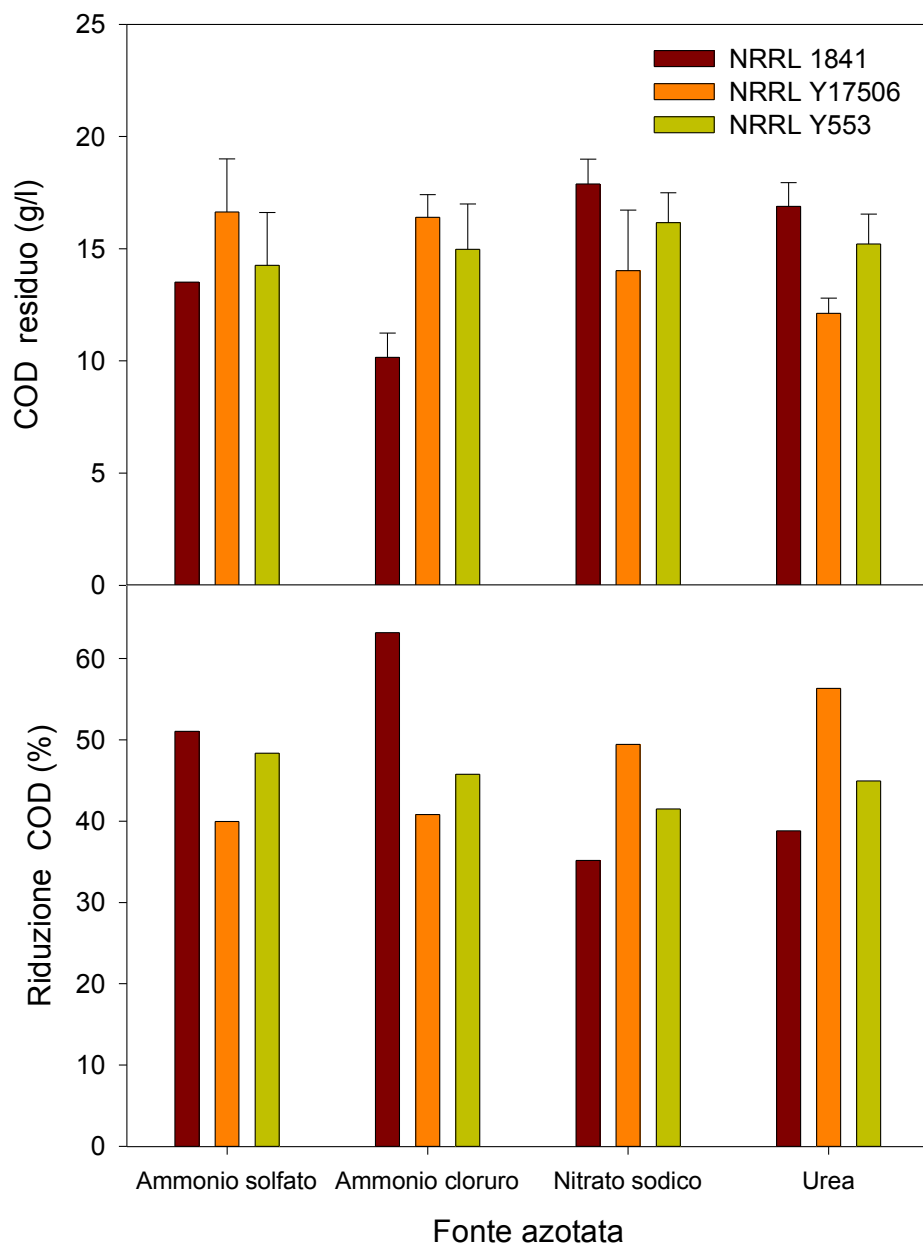


Figura 4.8 Effetto della fonte azotata aggiunta ad acque di vegetazione (AV4) sulla riduzione del COD da *P. citrinum* NRRL 1841, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono al momento di massima attività lipasica. Il valore di COD iniziale era pari a 25,6 g/l.

Figura 4.9 Effetto della fonte azotata aggiunta ad acque di vegetazione (AV4) sul consumo di zuccheri totali (S) da *P. citrinum* NRRL 1841, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono al momento di massima attività lipasica. Il valore iniziale degli zuccheri totali era pari a 8,80 g/l.

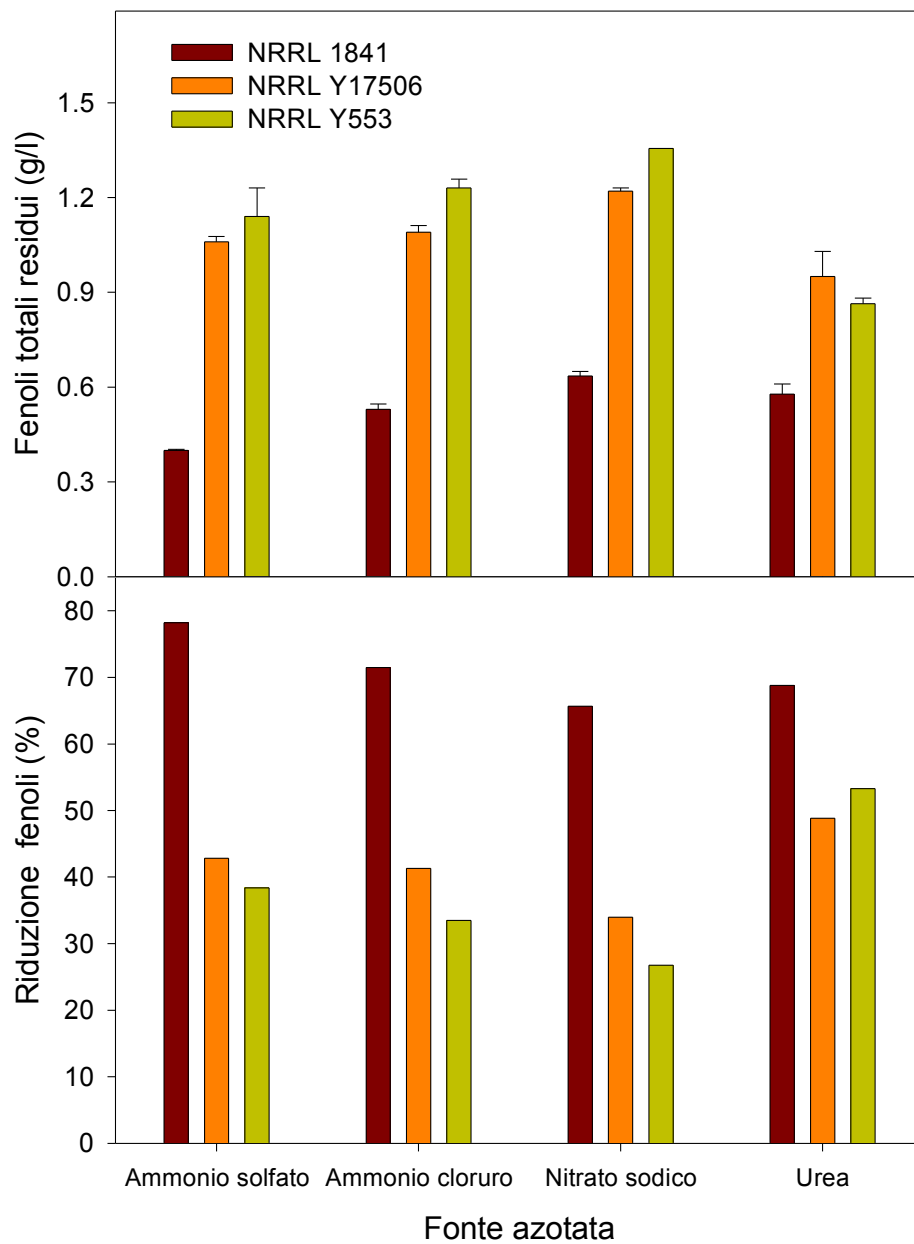


Figura 4.10 Effetto della fonte azotata aggiunta ad acque di vegetazione (AV4) sulla riduzione dei fenoli totali da *P. citrinum* NRRL 1841, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono al momento di massima attività lipasica. Il valore iniziale dei fenoli totali era pari a 1,85 g/l.

Dall'analisi del grafico di Figura 4.11, relativo alla produzione di lipasi, risulta evidente come, in presenza di oli, la produzione lipasica da *C. cylindracea* sia notevolmente maggiore di quella ottenuta da *P. citrinum* e *G. candidum*. In particolare per *C. cylindracea*, la massima produzione enzimatica (9,0 U/ml) si è osservata in presenza di olio d'oliva; con olio di mais e di soia si sono raggiunti livelli di attività enzimatica inferiori (6,43 e 6,34 U/ml, rispettivamente), ma comunque elevati se rapportati a quelli ottenuti in assenza di olio (1,24 U/ml).

Per quanto riguarda *P. citrinum* e *G. candidum*, invece, l'aggiunta di olio non ha sortito gli stessi effetti: per quest'ultimo non si sono osservate, infatti, differenze significative, mentre nel caso di *P. citrinum* solo l'aggiunta di olio di oliva ha aumentato significativamente ($P < 0,01$) la produzione rispetto all'assenza di olio (da 0,47 a 0,66 U/ml).

L'aggiunta di olio ha sempre favorito la crescita fungina (Figura 4.12), mentre non ha influito marcatamente sull'abbattimento del carico organico (Figura 4.13 e 4.14), ad eccezione della riduzione della componente fenolica (Figura 4.15) da parte di *G. candidum*: in questo caso, infatti, la defenolazione è risultata essere sfavorita dall'aggiunta di olio di oliva e mais. La notevole capacità defenolante di *P. citrinum* già sottolineata in precedenza non è stata influenzata dall'aggiunta di oli.

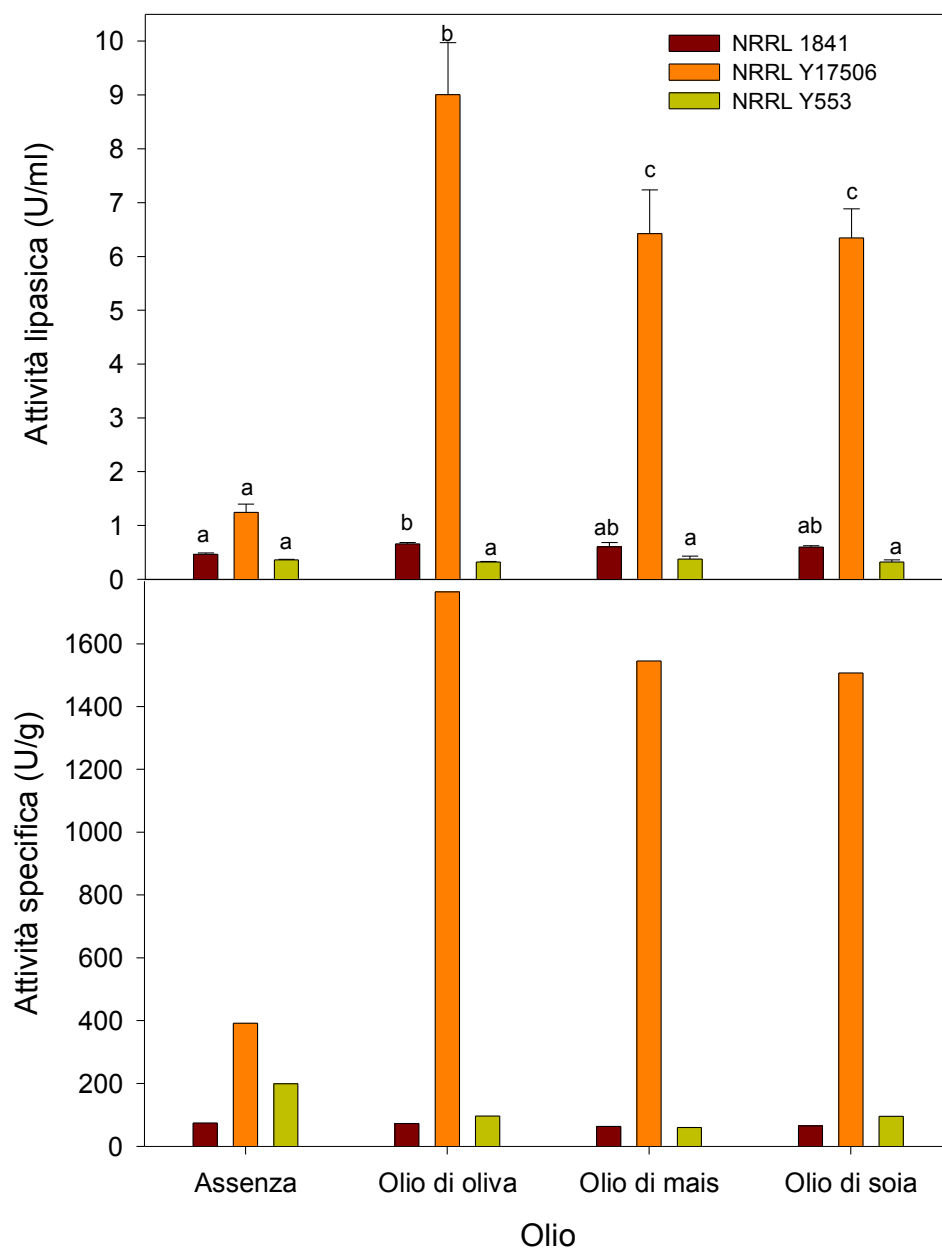


Figura 4.11 Effetto dell'aggiunta di olio ad acque di vegetazione (AV4) sulla produzione di lipasi e attività lipasica specifica (U/g di biomassa) da *P. citrinum* NRRL 1841, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono al momento di massima attività lipasica. Nell'ambito di uno stesso ceppo fungino, lettere uguali riportate al di sopra di ciascuna colonna, indicano differenze non statisticamente significative, secondo il Tukey test ($P < 0,01$).

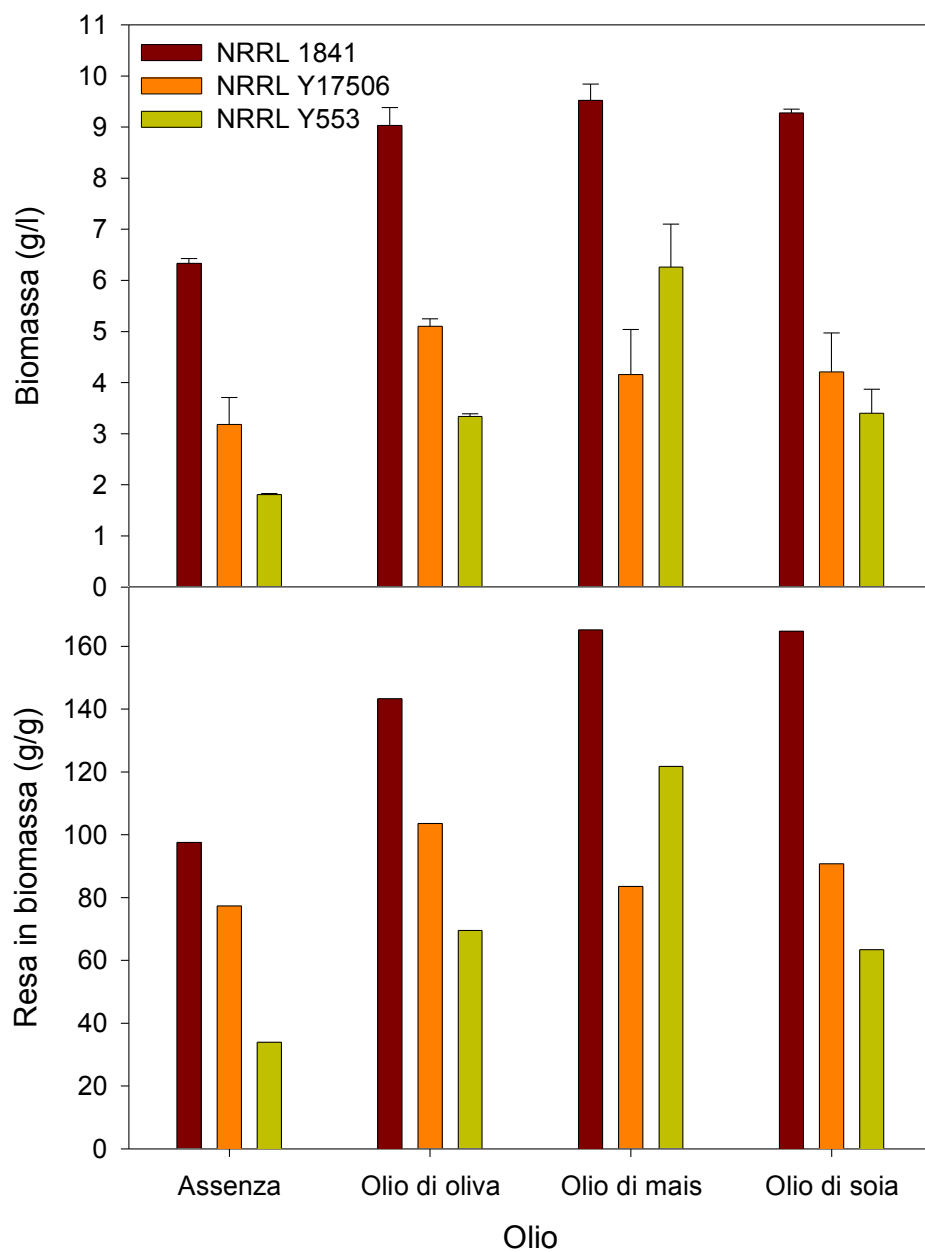


Figura 4.12 Effetto dell'aggiunta di olio ad acque di vegetazione (AV4) sulla biomassa formata e resa rispetto agli zuccheri totali consumati da *P. citrinum* NRRL 1841, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono alla fine della fermentazione (168^a ora).

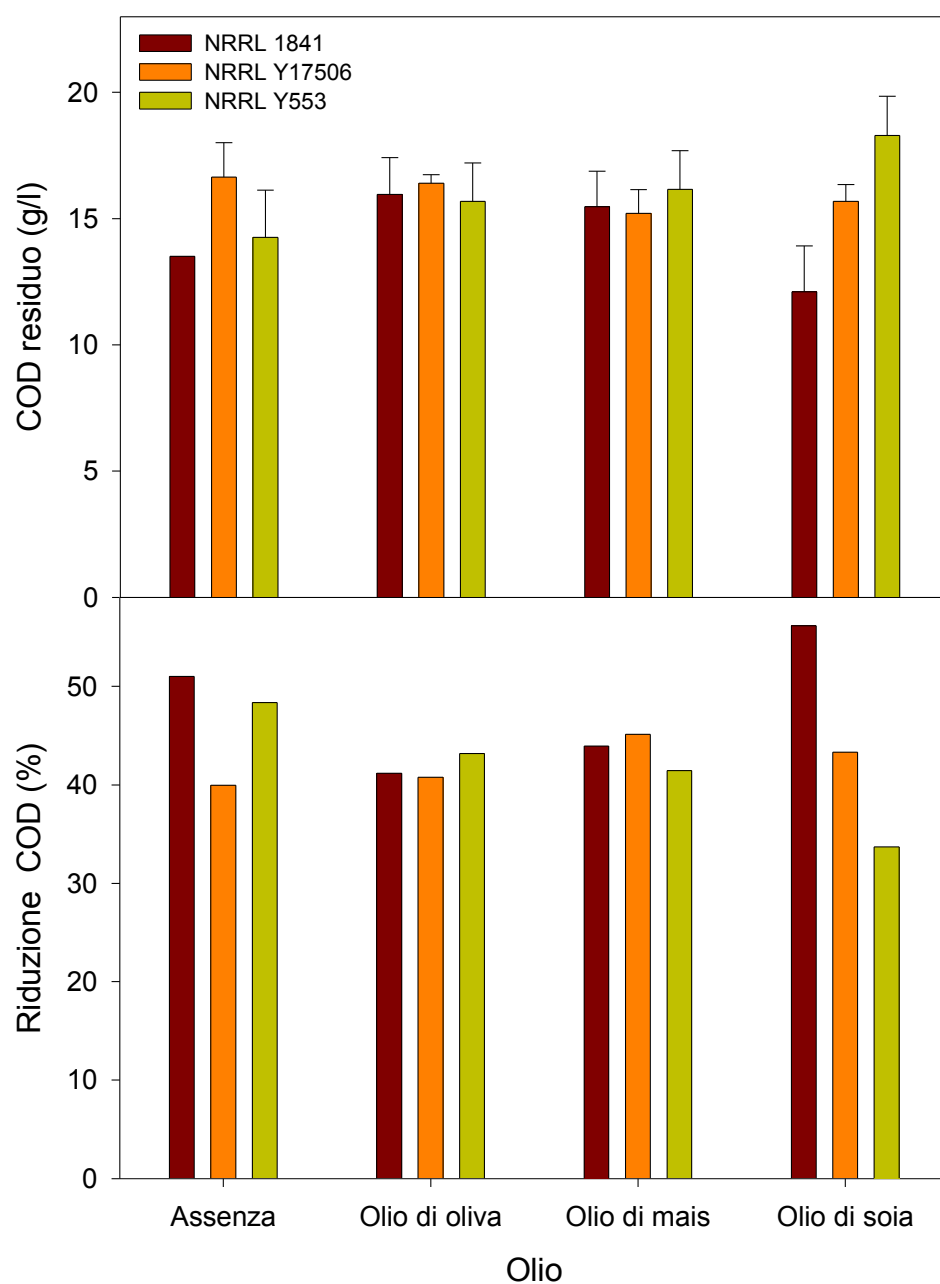


Figura 4.13 Effetto dell'aggiunta di olio ad acque di vegetazione (AV4) sulla riduzione del COD da *P. citrinum* NRRL 1841, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono al momento di massima attività lipasica. Il valore di COD iniziale era pari a 25,6 g/l in assenza di olio e 26,8 g/l in presenza di olio.

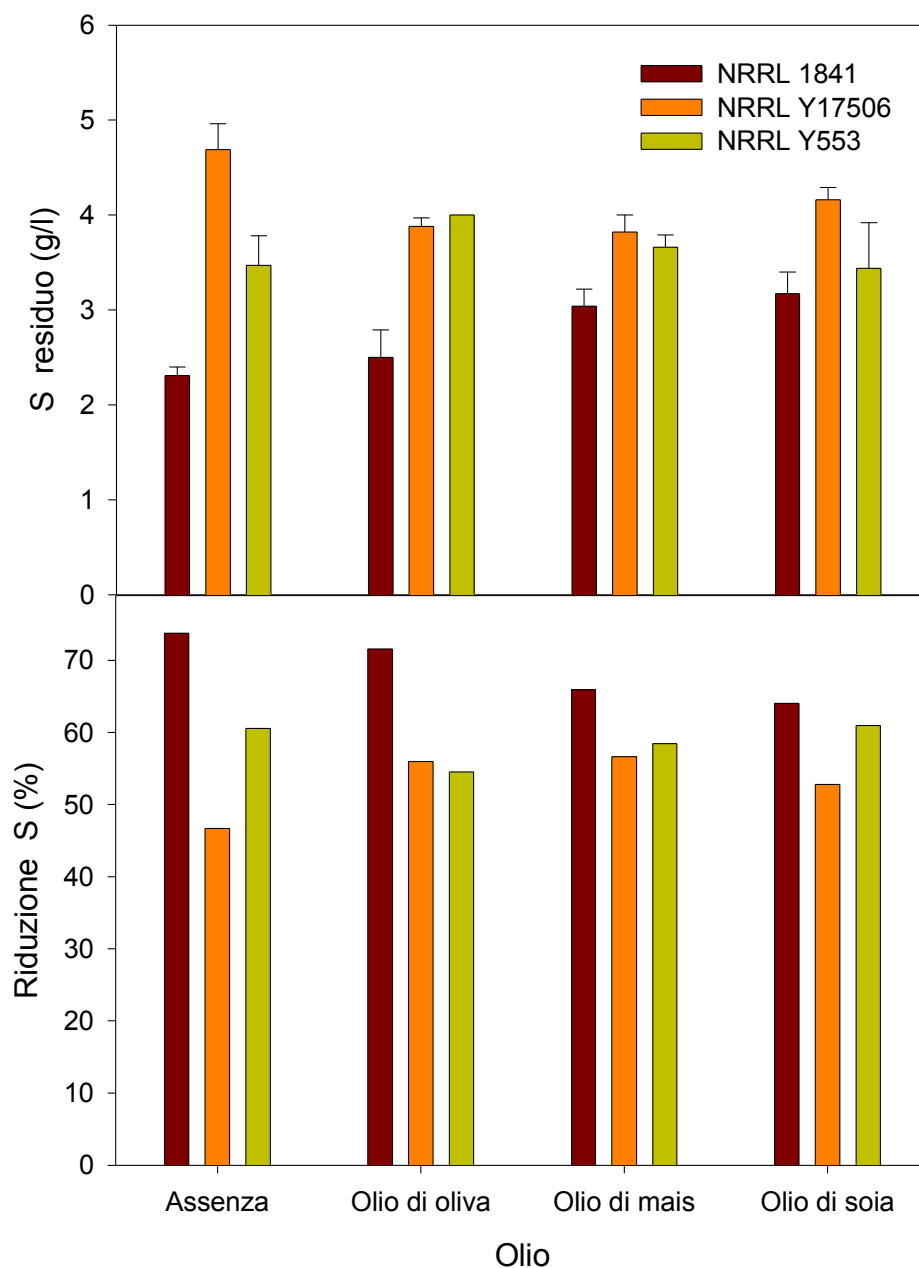


Figura 4.14 Effetto dell'aggiunta di olio ad acque di vegetazione (AV4) sul consumo di zuccheri totali (S) da *P. citrinum* NRRL 1841, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono al momento di massima attività lipasica. Il valore iniziale degli zuccheri totali era pari a 8,80 g/l.

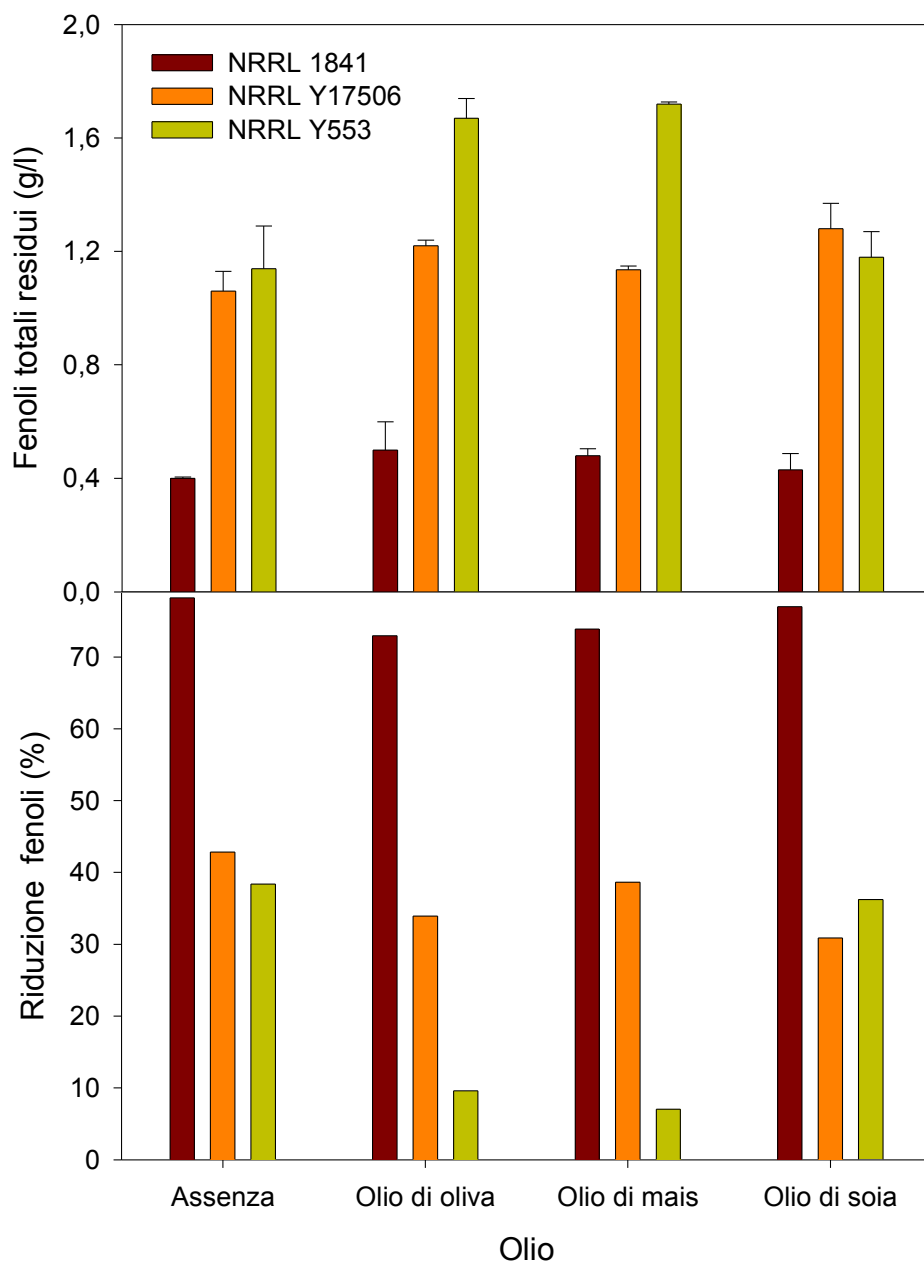


Figura 4.15 Effetto dell'aggiunta di olio ad acque di vegetazione (AV4) sulla riduzione dei fenoli totali da *P. citrinum* NRRL 1841, *C. cylindracea* NRRL Y-17506 e *G. candidum* NRRL Y-553. I valori si riferiscono al momento di massima attività lipasica. Il valore iniziale dei fenoli totali era pari a 1,85 g/l.

4.7 PRODUZIONE DI LIPASI DA *PENICILLIUM CITRINUM* NRRL 1841 COLTIVATO SU UN TERRENO A BASE DI ACQUE DI VEGETAZIONE

Durante il primo step di questa tesi di dottorato è stato condotto uno screening con diversi microrganismi finalizzato ad individuare quali fossero in grado di crescere su un terreno a base di AV e di produrre lipasi extracellulari. Inoltre, è stato effettuato uno studio preliminare per comprendere le richieste nutrizionali (tipologia di AV, tipo di olio e di fonte azotata) di alcuni dei microrganismi selezionati per la loro buona capacità di crescita sulle AV, di produrre lipasi extracellulare e di abbattere il carico inquinante del refluo finale. Tra gli organismi sottoposti a questa indagine, il ceppo NRRL 1841 del fungo *Penicillium citrinum* si è rivelato particolarmente promettente poiché un'apprezzabile produzione di lipasi è stata accompagnata da una significativa riduzione del carico organico e dei fenoli presenti nel refluo. Inoltre, la produzione enzimatica da parte di questo fungo è sembrata essere costitutiva a differenza delle lipasi prodotte da *C. cylindracea* che sono indotte dalla presenza di olio di oliva, come è emerso dagli studi precedenti. Per queste ragioni, nel corso di questa fase si è tentato di valutare più approfonditamente l'idoneità di *P. citrinum* per gli scopi sopra menzionati. In particolare, l'obiettivo principale è stato quello di valutare quali parametri influenzassero la produzione di lipasi e a questo scopo è stato utilizzato un approccio fattoriale.

4.7.1 Scelta delle AV

In precedenza, il ceppo in studio aveva fornito livelli di produzione comparabili su diverse tipologie di acque reflue di frantoio caratterizzate da diversi rapporti COD/zuccheri totali mostrando quindi una buona versatilità di impiego al variare della composizione del refluo stesso.

Prima di procedere all'analisi fattoriale, è stato condotto un esperimento preliminare volto a riconfermare quanto precedentemente osservato. A tale scopo, il terreno di produzione a base di AV è stato integrato con olio di oliva 3,0 g/l, NH_4Cl in modo da fornire una quantità di azoto pari a 0,63 g/l ed estratto di lievito 0,5 g/l. Il pH, prima della sterilizzazione, è stato portato a 6,1 con NaOH 1,0 M. Inoltre, sono stati selezionati due effluenti, uno prelevato direttamente dal decanter di un impianto a tre fasi (AV2), il secondo (AV4), invece, prelevato da un vascone di raccolta (inferno) con un tempo medio di permanenza di 3-4 giorni (Tabella 3.1-3.2). La finalità di questo

esperimento è stato anche di verificare eventuali variazioni di produzione dovute a modifiche intervenute nel corso della permanenza nell'inferno.

La Figura 4.16 mostra l'andamento della produzione di lipasi e la rimozione percentuale dei fenoli in funzione del tempo di incubazione. Le curve di produzione enzimatica mostrano andamenti molto simili con un primo picco a 48 ore dall'inoculo ed un ripido incremento a partire dalle 96 ore che non si è arrestato fino al termine del periodo fermentativo selezionato (168 ore). L'attività lipolitica ottenuta sulle AV4, lo stesso refluo utilizzato nella fase preliminare di studio, ha riconfermato quanto precedentemente osservato (0,616 U/ml vs 0,660 U/ml). Tuttavia, i livelli massimi di produzione ottenuti sul refluo prelevato dal decanter sono significativamente più elevati di quelli ottenuti su acque di inferno (1,030 vs 0,616 U/ml, rispettivamente). Anche l'entità della rimozione del carico organico risulta migliore nel primo effluente rispetto al secondo (63,6 vs 48,4%, rispettivamente, dopo 168 ore).

Al contrario, le percentuali di rimozione dei fenoli totali risultano più elevate sulle acque di inferno rispetto a quelle da decanter (75,68 vs 62,4%, rispettivamente, dopo 168 ore) ed inoltre la cinetica di rimozione appare più rapida nelle prime ore raggiungendo praticamente un plateau dopo 72 ore. Tale risultato è abbastanza inaspettato in quanto durante il periodo di permanenza nell'inferno, i fenoli soggiacciono a processi di auto-ossidazione che conducono alla formazione di polimeri di non facile degradabilità o alla formazione di chinoni. Di conseguenza, in queste condizioni, la frazione monomerica di più facile degradabilità biologica risulta meno rappresentativa rispetto alle acque fresche. Tuttavia, va anche tenuto presente che la concentrazione di fenoli nelle acque da inferno era significativamente più bassa e pari a poco più della metà di quella del refluo da decanter. Inoltre, non è da escludere che fenomeni di adsorbimento di detti polimeri sulla biomassa microbica possano spiegare il precoce raggiungimento di un plateau di rimozione in un fungo per il quale non sono tuttora descritti sistemi enzimatici degradativi a carico di molecole aromatiche.

4.7.1 Ottimizzazione della composizione del terreno colturale per la produzione di lipasi da *P. citrinum* coltivato su un terreno a base di AV mediante disegno fattoriale

La messa a punto di terreni colturali per lo studio della fisiologia di produzione di metaboliti di origine microbica prevede una valutazione quanti-qualitativa delle diverse componenti in essi presenti (tipo e/o concentrazione). L'approccio di tipo classico

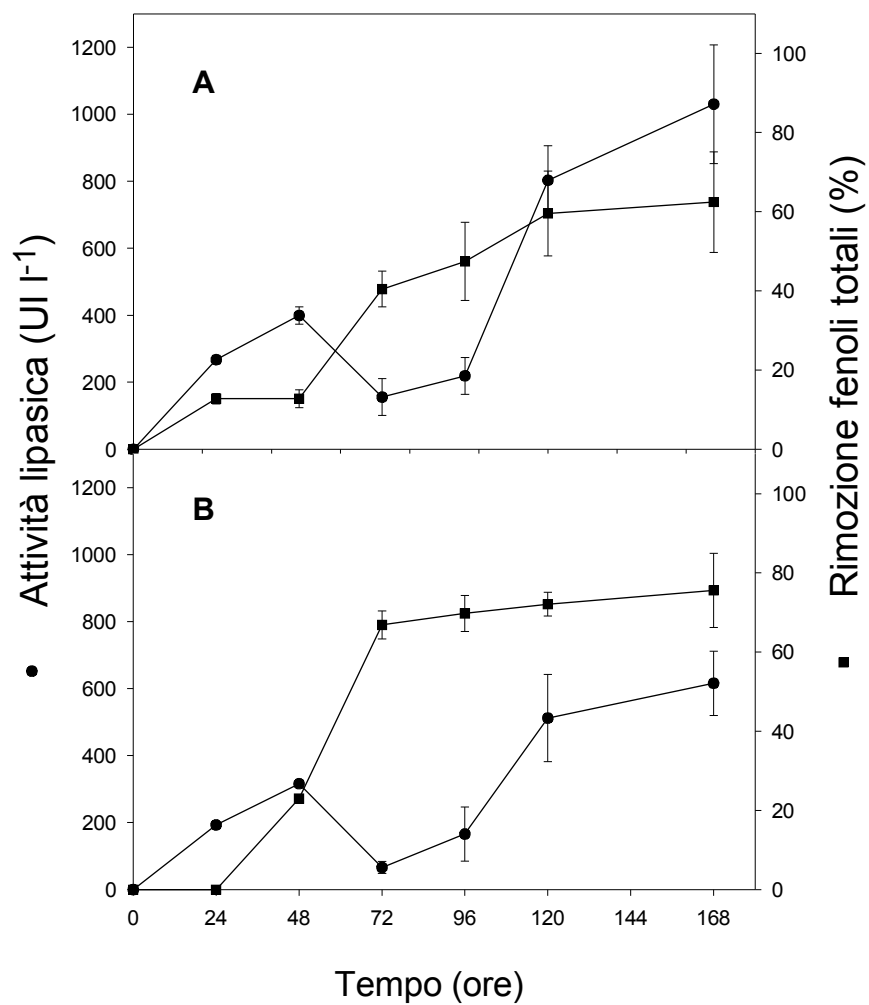


Fig. 4.16 Andamento nel tempo della produzione di lipasi e della rimozione percentuale di fenoli totali da parte di *P. citrinum* NRRL 1841 cresciuto su AV-2 (A) e AV-4 (B).

studia l'effetto di singole componenti e mantiene costante il resto delle variabili; quindi, nel caso in cui le variabili oggetto di studio siano numerose, è necessario realizzare un numero elevato di esperimenti che comunque non permettono di valutare l'effetto combinato dei diversi fattori. Al contrario, metodi che fanno uso di strumenti statistici, quali l'analisi multivariata, forniscono, con un numero ridotto di esperimenti, indicazioni per ottenere il massimo responso.

Attraverso l'uso di disegni fattoriali, l'esame di tutte le possibili combinazioni è di tipo fattoriale e il numero degli esperimenti è pari a x^n (n è il numero di variabili, x è il numero di livelli di ciascuna variabile).

Recentemente, un approccio sperimentale di questo tipo è stato applicato allo studio di ottimizzazione della produzione di lipasi da parte di un'altra specie appartenente al genere *Penicillium* (Vanot et al., 2001). Nel caso citato, tuttavia, come anche in numerosi altri studi sugli effetti delle condizioni colturali (Pimentel et al., 1997; Tan et al., 2004; de Azaredo et al., 2007), l'ottimizzazione è stata condotta su un mezzo colturale definito, contrariamente al presente lavoro di tesi nel quale il substrato di crescita era un refluo.

E' stato impiegato un approccio fattoriale basato su un disegno sperimentale composito centrale per valutare l'effetto di tre variabili (concentrazione NH_4Cl , concentrazione estratto di lievito e pH iniziale) del terreno di coltura. Tale approccio è mirato ad individuare l'effetto principale di ciascuna variabile nonché la presenza di eventuali interazioni tra di esse. La sperimentazione è stata condotta utilizzando le AV2 che dalla prova precedente sono risultate più adatte a questo tipo di produzione microbica.

La scelta delle tre variabili studiate prende spunto dal fatto che numerosi lavori condotti con specie del genere *Penicillium* dedicano molto spazio alla individuazione delle fonti azotate più adatta e alla sua concentrazione ottimale, al migliore livello di pH iniziale e alla concentrazione ottimale dei principi di crescita (estratto di lievito, in particolare) (Miranda et al., 1999; Pimentel et al., 1997).

In Tabella 4.1 è riportato la struttura del disegno sperimentale ed i relativi risultati ottenuti per ogni combinazione delle variabili in esame con riferimento alla massima produzione di lipasi e gli abbattimenti di COD e fenoli totali. Si può notare che i valori dell'attività lipolitica variano in un ampio range (da 0,208 a 1,272 U/ml).

La Tabella 4.2 mostra anche gli scarti osservati tra i dati osservati e quelli predetti dal modello. I dati ottenuti sono ben correlati da un'equazione polinomiale di secondo

grado come testimoniato dalla bassa entità degli scarti ottenuti tra i dati predetti dal modello e quelli osservati.

Il coefficiente di correlazione (R^2) aggiustato per il grado di libertà è stato di 0,93, questo indica che il modello statistico può spiegare il 93% della variabilità nei risultati (Tabella 4.3). Il valore F del modello di 36,7 ($P < 0,001$) indica che i termini del modello sono altamente significativi. In aggiunta, il valore di F_{ME} di 7,11 ($P = 0,129$), calcolato come il rapporto tra i quadrati delle medie dell'errore del modello e dell'errore della replica, indica che la probabilità di una mancata correlazione non è statisticamente significativa (Tabella 4.3). La Tabella 4.3 mostra anche che, l'intercetta, i coefficienti di primo e secondo ordine delle variabili indipendenti sono altamente significativi ad eccezione del coefficiente di secondo ordine per l'estratto di lievito.

Dall'analisi dei dati riportati in Tabella 4.1, si può osservare come la concentrazione di cloruro ammonico pari a 3 g/l sia quella ottimale anche se, come si desume dalla variabilità dei dati, questa concentrazione non sembra fornire dati di produzione significativamente diversi da un punto di vista statistico da quelli ottenuti a 2 g/l.

Sulla base di indicazioni di letteratura è stato apportato anche estratto di lievito quale fonte di coenzimi e cofattori minerali. L'analisi dell'effetto principale mostra che la concentrazione ottimale risulta essere pari ad 1 g/l (Tabella 4.1).

All'interno dell'intervallo selezionato il valore di pH ottimale di produzione risulta essere pari a 6,1-6,2 (Tabella 4.1). L'analisi dell'interazione tra pH e azoto (Figura 4.17) mostra come le differenze che risultano cospicue a pH 5,1 tra i due livelli estremi di N impiegati nel modello tendano ad attenuarsi e addirittura ad annullarsi a pH 7,1. Il grado di interazione tra pH ed azoto risulta essere molto evidente alla concentrazione di 4 g/l, come si può vedere dalla figura 4.18.

In Figura 4.19, sono mostrati i grafici di previsione di produzione con i relativi intervalli di confidenza ($P = 0,05$) in funzione delle variabili studiate. Tali grafici confermano quanto precedentemente menzionato relativamente agli effetti principali delle variabili stesse.

In Figura 4.20 sono riportate le superfici di responso della produzione di lipasi in funzione delle tre variabili in esame.

Al fine di individuare i livelli ottimali delle variabili in studio, è stata utilizzata la funzione optimizer del programma Modde i cui risultati sono mostrati nella Tabella 4.4. I livelli indicati nell'algoritmo di ottimizzazione sono stati impiegati nelle prove successive.

Tabella 4.1 Effetto della concentrazione di NH_4Cl (X_1), estratto di lievito (X_2) e pH (X_3) sullo sviluppo, sulla produzione di lipasi e sulla riduzione percentuale di COD e fenoli da *P. citrinum* NRRL 1841; le colonne a sinistra riportano le tesi proposte dal disegno fattoriale. I dati sono riferiti al tempo di massima produzione enzimatica.

Tesi	X_1 (g/l)	X_2 (g/l)	X_3	Lipasi (UI/l)	COD (%)	Fenoli (%)	Biomassa (g/l)
1	2	0,5	5,1	680	78	42	8,2
2	4	0,5	5,1	208	81	58	7,5
3	2	1,5	5,1	869	70	50	8,7
4	4	1,5	5,1	300	67	57	7,2
5	2	0,5	7,1	537	78	45	8,9
6	4	0,5	7,1	580	91	52	9,5
7	2	1,5	7,1	759	77	43	9,3
8	4	1,5	7,1	600	75	56	9,6
9	2	1	6,1	1100	66	45	13,3
10	4	1	6,1	945	72	50	12,5
11	3	0,5	6,1	1091	72	49	14,0
12	3	1,5	6,1	1179	56	51	15,0
13	3	1	5,1	790	76	50	9,0
14	3	1	7,1	1070	72	54	9,5
15	3	1	6,1	1202	56	43	15,2
16	3	1	6,1	1272	56	45	15,0
17	3	1	6,1	1250	57	44	15,0

Tabella 4.2 Differenza tra dati predetti e dati osservati, dal modello fattoriale, dell'attività lipolitica ottenuta da *P. citrinum* NRRL 1841 cresciuto su un terreno a base di AV2 e intervallo di confidenza

Tesi	Dati osservati	Dati predetti	Dati osservati – dati predetti	Intervallo di confidenza
1	680	684,064	-4,06445	105,631
2	208	190,415	17,5855	105,631
3	869	806,264	62,7355	105,631
4	300	312,615	-12,6146	105,631
5	537	592,614	-55,6144	105,631
6	580	561,465	18,5353	105,631
7	759	714,815	44,1854	105,631
8	600	683,665	-83,6647	105,631
9	1100	1147,24	-47,2423	102,758
10	945	884,842	60,1576	102,758
11	1091	1067,44	23,5575	102,758
12	1179	1189,64	-10,6425	102,758
13	790	853,642	-63,6425	102,758
14	1070	993,443	76,5575	102,758
15	1202	1249,94	-47,9438	61,2419
16	1272	1249,94	22,0562	61,2419
17	1250	1249,94	0,0561523	61,2419

Tabella 4.3. Minimi quadrati stimati delle variabili, concentrazione NH_4Cl (X_1) ed estratto di lievito (X_2) e pH iniziale (X_3). Nell'ultima colonna sono mostrati i parametri statistici che misurano la correlazione e la significatività del modello

Coefficiente	Valore [‡]	Parametro [§]	Valore
Intercetta β_0	$1227 \pm 35,8^{***}$	R^2	0,96
β_1	$-131,2 \pm 27,4^{***}$	R^2_{adj}	0,93
β_2	$61,1 \pm 17,4^*$	F	$36,7^{***}$
β_3	$69,9 \pm 27,4^*$	F_{ME}	$7,11^{n.s.}$
β_1^2	$-275,1 \pm 49,9^{***}$	Livello di confidenza	0,95
β_3^2	$-367,6 \pm 49,9^{***}$		
$\beta_1\beta_3$	$115,6 \pm 30,7^{**}$		

[‡]coefficienti stimati $\pm$ errore standard e livelli significativi: * $P \leq 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; n.s. non significativo.

[§] R^2 , coefficiente di correlazione; R^2_{adj} , coefficiente di correlazione aggiustato per i gradi di libertà; F , rapporto tra i quadrati delle medie della regressione e dei residui; F_{ME} , rapporto tra i quadrati delle medie dell'errore del modello e dell'errore della replica

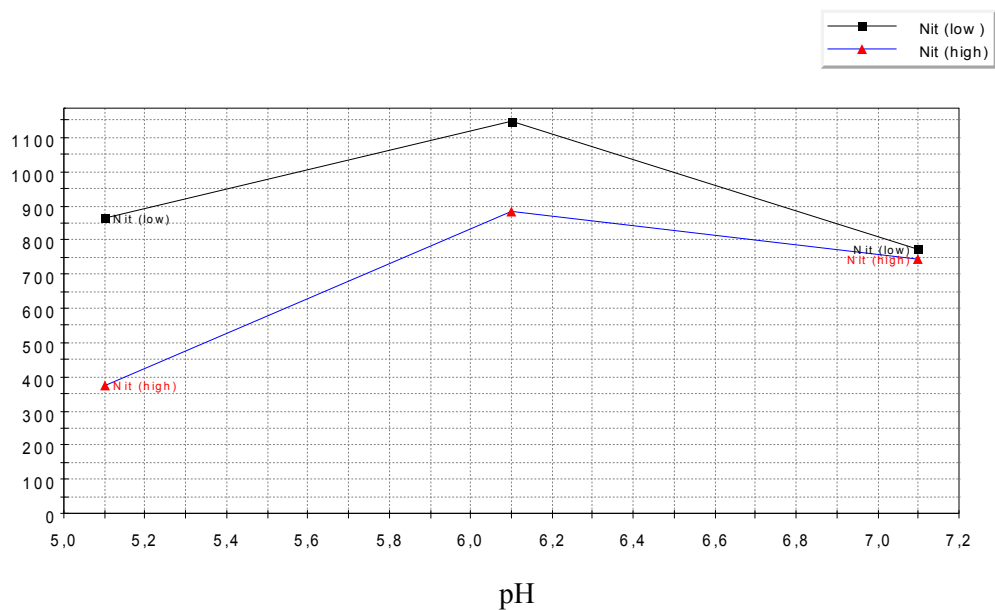


Figura 4.17 Interazione tra pH e livelli di concentrazione massima e minima di NH_4Cl in relazione alla produzione di lipasi da *P. citrinum* NRRL 1841 coltivato su un terreno a base di AV2

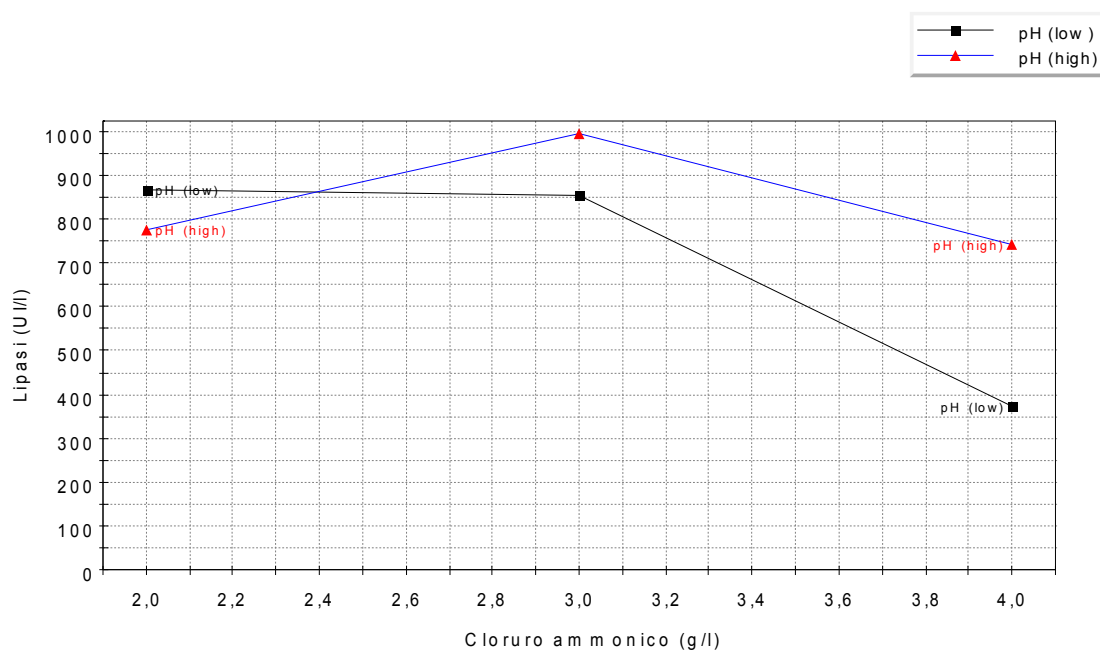
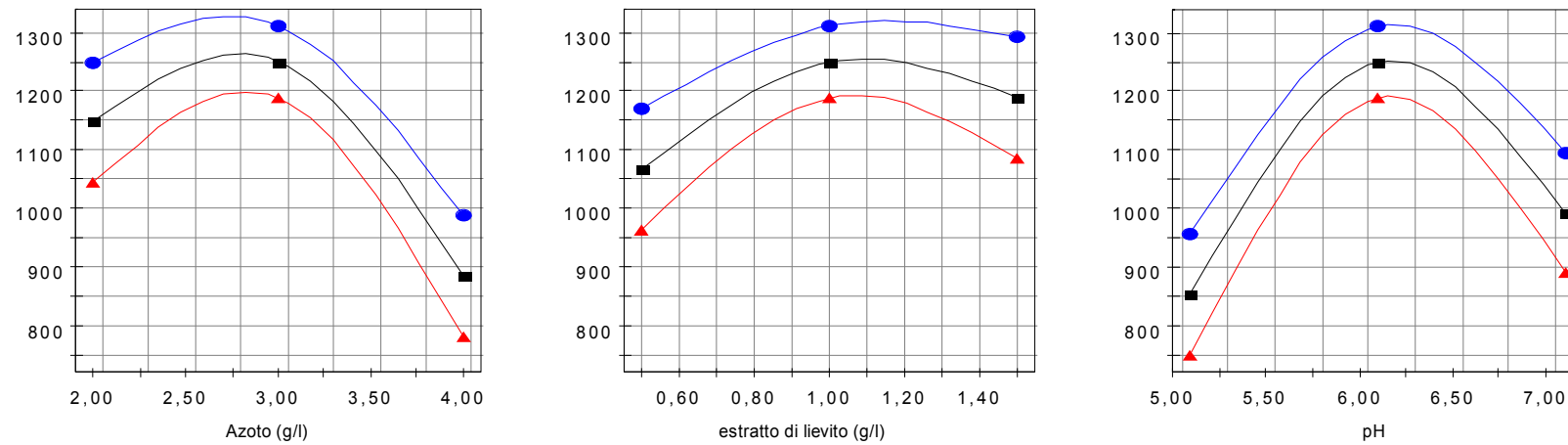


Figura 4.18 Interazione tra concentrazione di NH_4Cl e livelli, massimo e minimo, di pH in relazione alla produzione di lipasi da *P. citrinum* NRRL 1841 coltivato su un terreno a base di AV2

Tabella 4.4 “Optimizer” del disegno fattoriale

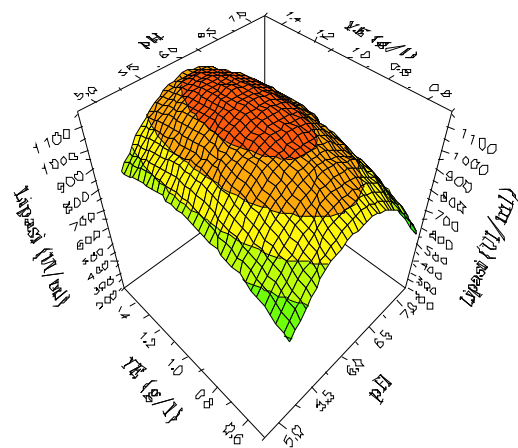
Livelli ottimali predetti			Produzione prevista
NH₄Cl	Estratto di lievito	pH	Lipasi
(g/l)	(g/l)		(UI/l)
2,7385	1,13	6,16	1277,15
2,7344	1,12	6,16	1277,15
2,7405	1,12	6,15	1277,14
2,729	1,13	6,15	1277,14
2,7333	1,12	6	1268,77
2,7333	1,12	6	1268,77
2,7333	1,12	6	1268,77
2,7333	1,12	6	1268,77

Investigation: chiara_1 (MLR)
Prediction Plot

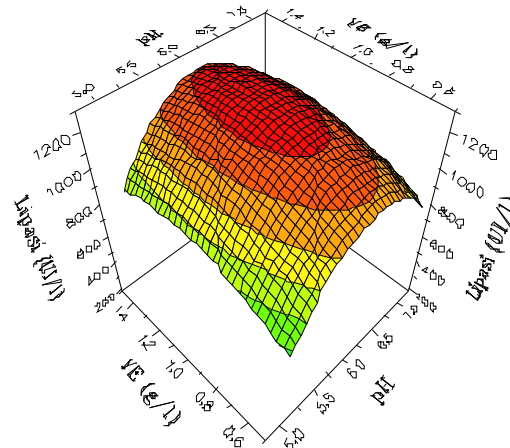


N=17 DF=9 Conf. lev.=0,95

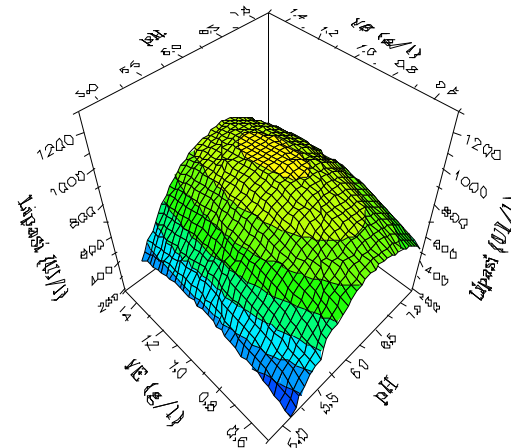
Figura 4.19 Grafici di previsione di produzione di lipasi da *P. citrinum* NRRL 1841 coltivato su un terreno a base di AV2 e relativi intervalli di confidenza ($P = 0,05$) in funzione delle variabili studiate.



A



B



C

Figura 4.20. Superfici di responso della produzione di lipasi di *P. citrinum* NRRL 1841 coltivato su un terreno a base di AV2 in funzione della concentrazione di estratto di lievito e del pH a 2 (A) 3 (B) e 4 (C) g/l di NH_4Cl .

L'applicazione dello stesso approccio nell'analisi dei dati di riduzione della domanda chimica di ossigeno da parte del microrganismo in corrispondenza del raggiungimento dei massimi di attività enzimatica non ha dato risultati paragonabili a quelli ottenuti per la produzione di lipasi in termini di correlazione tra dati osservati e dati predetti e di prevedibilità del responso. In altre parole, il modello solo in parte è in grado di prevedere la variabilità dei dati sperimentali. Ciò è stato ulteriormente confermato dall'analisi della varianza, nonché dai valori elevati di P relativi al calcolo dei coefficienti di primo e secondo ordine. Di conseguenza, non siamo stati in grado di stabilire alcuna relazione tra le variabili studiate e il responso "riduzione di COD". Indipendentemente da questo, si può comunque osservare che *P. citrinum* utilizza le componenti organiche presenti nel refluo, indipendentemente dai livelli supplementari di azoto ed estratto di lievito e dalle condizioni di pH del mezzo liquido, dando luogo a rimozioni del COD superiori al 55%. E' possibile presumere che gli apporti effettuati in termini di azoto e di estratto di lievito, indipendentemente dalle loro concentrazioni, siano già a livelli che consentono una crescita ottimale o subottimale del fungo e quindi la sua capacità di metabolizzare le componenti del refluo.

La stessa valutazione sulle scarse indicazioni fornite dal modello può essere fatta per quanto concerne la rimozione percentuale di fenoli totali ottenuta in corrispondenza dei massimi di attività. Ciò è stato dedotto dalla bassa correlazione tra dati predetti ed osservati nonché dall'analisi della varianza e dagli elevati valori di P relativi ai coefficienti di primo e secondo ordine con l'unica eccezione rappresentata dai livelli di azoto ($P = 0,00117$). Si può osservare che la concentrazione dei fenoli totali si è mantenuta stabile nei controlli condotti nelle stesse condizioni impiegate per la crescita del microrganismo. Di conseguenza, le riduzioni osservate possono essere attribuite alla crescita del fungo. La dipendenza della riduzione dei fenoli dai livelli di azoto possono essere attribuibili ad un effetto di mero adsorbimento da parte della biomassa o ad aumentati livelli di sintesi proteica di eventuali ossidasi coinvolte nel metabolismo dei fenoli. Tuttavia, va precisato che in letteratura non sono presenti segnalazioni riguardanti la produzione di fenolossidasi da parte di questo fungo. Inoltre, tentativi finalizzati alla ricerca di attività laccasica nei brodi colturali di *P. citrinum* hanno rivelato l'assenza dell'enzima.

Una buona correlazione tra dati predetti ed osservati è stata ottenuta per la produzione di biomassa. Il modello ottenuto fornisce una buona capacità previsionale per questo parametro come indicato dall'elevato valore di Q^2 (0,85).

E' importante rilevare che l'analisi dei dati di produzione di biomassa confermano quanto ipotizzato a proposito del COD relativamente ad una scarsa influenza delle variabili azoto ed estratto di lievito. L'unico parametro che risulta essere determinante è il pH.

In conclusione, la combinazione, delle variabili in esame, ottimizzata dal modello è stata la seguente: 2,74 g/l di NH_4Cl , 1,1 g/l di estratto di lievito e pH iniziale di 6,15. Per validare il risultato ottenuto, è stata condotta una prova su due tipologie di AV (AV2 e AV5), con carico organico simile, utilizzando la migliore combinazione delle variabili, che ha confermato la bontà predittiva del modello. Per entrambe le AV usate (AV2 e AV5), la massima attività lipolitica che è stata ottenuta dopo 192 h di fermentazione è stata molto simile a quella predetta dal modello (1,232 e 1,208 U/ml, rispettivamente, vs 1,242 U/ml; i dati non sono mostrati). Per quanto riguarda l'effetto del pH iniziale sulla produzione di lipasi, il valore ottimale (6,15) è più basso di quello riportato da Sztajer & Maliszewska (1989). L'aggiunta di estratto di lievito in un terreno contenente cloruro di ammonio ha permesso di aumentare la produzione di enzima in accordo con gli studi precedentemente condotti con un altro ceppo di *P. citrinum* (Pimentel et al., 1994 e 1997).

4.7.2 Produzione di lipasi da *P. citrinum* coltivato sul terreno ottimizzato a base di AV in bioreattore

In base ai risultati ottenuti nel precedente studio è stato effettuato il trasferimento del processo di produzione di lipasi da *P. citrinum* NRRL 1841 dalla beuta al bioreattore da banco nelle condizioni ottimizzate.

Il trasferimento di un processo di produzione da coltura agitata (a livello di beuta) a fermentatore è sempre una fase delicata di studio. Spesso avviene che un processo di produzione di estremo potenziale interesse non arrivi nemmeno ad essere studiato a livello di impianti pre-pilota in quanto il passaggio a fermentatore da banco risulta impossibile.

Non è infatti raro che il trasferimento di scala crei condizioni sfavorevoli al microrganismo produttore al punto che questo non riesca più a produrre nemmeno tracce del metabolita in oggetto.

La produzione di lipasi a livello di fermentatore è stata studiata per numerosi ceppi fungini (Ibrahim et al., 1987; Jacobsen et al., 1989; Freire et al., 1997; Elibol & Ozer, 2000). Inoltre, un recente studio ha mostrato che la produttività della lipasi da *G.*

candidum in air-lift è stata circa il 60% più alta di quella in STR (Burkert et al., 2005). Gli stessi autori hanno suggerito di lavorare in STR a velocità di agitazione tra 300 e 350 rpm, in accordo con altri studi condotti con *A. terreus* (Gulati et al., 2000).

Nel presente lavoro sono stati utilizzati due fermentatori da banco: un reattore ad agitazione meccanica (il tradizionale STR, “Stirred Tank Reactor”) e uno ad agitazione pneumatica (reattore Air-lift). Nel bioreattore STR l’agitazione è effettuata meccanicamente per mezzo di giranti. La velocità di agitazione è un parametro molto critico che influenza il mescolamento e il trasferimento di massa, di nutrienti e di ossigeno. Allo stesso tempo, però, può provocare effetti negativi quali la rottura delle cellule e l’autolisi, causando la diminuzione della produttività enzimatica (Liu et al., 2003), o il cambiamento morfologico delle cellule (Kahar et al., 2002). Per ridurre eventualmente lo stress dell’agitazione sulle cellule si può utilizzare un reattore di tipo air-lift in cui l’agitazione non è tipo meccanico ma pneumatico. Questo tipo di reattore è inoltre caratterizzato da condizioni di forte aerazione che, tuttavia, in alcuni casi possono influire negativamente sulla produzione.

Conseguentemente, nel presente approccio preliminare al trasferimento di scala del processo, si è preferito utilizzare due tipologie di reattore così da aumentare la probabilità di ottenere una prima risposta positiva alla fattibilità del trasferimento. Le condizioni di agitazione e di aerazione sono state settate in modo da ottenere valori simili di K_{La} (0,125 e 0,131 s^{-1} in airlift e STR rispettivamente) per facilitare il confronto.

In Figura 4.21 è mostrato l’andamento nel tempo della produzione di lipasi e della crescita di *P. citrinum* in reattore Airlift (A) e STR (B). La stessa figura riporta anche il consumo degli zuccheri totali e la rimozione dei fenoli totali nel tempo, espressa come concentrazione residua nel mezzo colturale.

In entrambi i casi, l’attività lipolitica extracellulare ha raggiunto il suo picco massimo a 188 h dall’inoculo. La comparsa di attività enzimatica è stata, però, anticipata in STR raggiungendo 0,133 U/ml dopo 20 h di fermentazione e il massimo di attività è stato significativamente più alto di quello raggiunto in Airlift (0,735 vs 0,430 U/ml, rispettivamente).

Senza distinzione per il tipo di bioreattore, la cinetica di produzione della lipasi non sembra essere correlata con la produzione di biomassa. In STR, la produzione massima di biomassa è stata anticipata rispetto all’Airlift (Figura 4.21).

Per quanto riguarda la riduzione dei fenoli nel mezzo di crescita è stata più elevata in STR che in Airlift (85 vs 70 %). La diminuzione degli zuccheri è stata notevole in entrambe le tipologie di bioreattore in particolare nelle prime 60 h: in questo breve arco di tempo la loro concentrazione iniziale si è ridotta dell'90%, nelle ore successive il valore minimo è rimasto quasi costante. Anche l'abbattimento del COD ha avuto un andamento simile in ambedue i fermentatori, ed è stato circa del 50 %.

Le produzioni di lipasi e le produttività ottenute con le due tipologie di reattori sono state significativamente più basse di quelle raggiunte in beuta. Comunque, l'attività lipolitica ottenuta in STR è stata più elevata di quella ottenuta in Airlift. Anche la riduzione dei fenoli è stata maggiore in STR. Inoltre, bisogna anche sottolineare che nel reattore di tipo Air-lift si è generata molta schiuma e, conseguentemente, è stato necessario aggiungere antischiuma con una discreta frequenza. Per tutti questi motivi, si può concludere che il fermentatore STR sia più adatto per la crescita di *P. citrinum* su un terreno a base di AV per la produzione di lipasi, rispetto a quello di tipo Air-lift e, comunque, è necessaria ancora una ulteriore ottimizzazione in questo tipo di fermentatore prima di poter valutare la fattibilità tecnico-economica del bioprocesso.

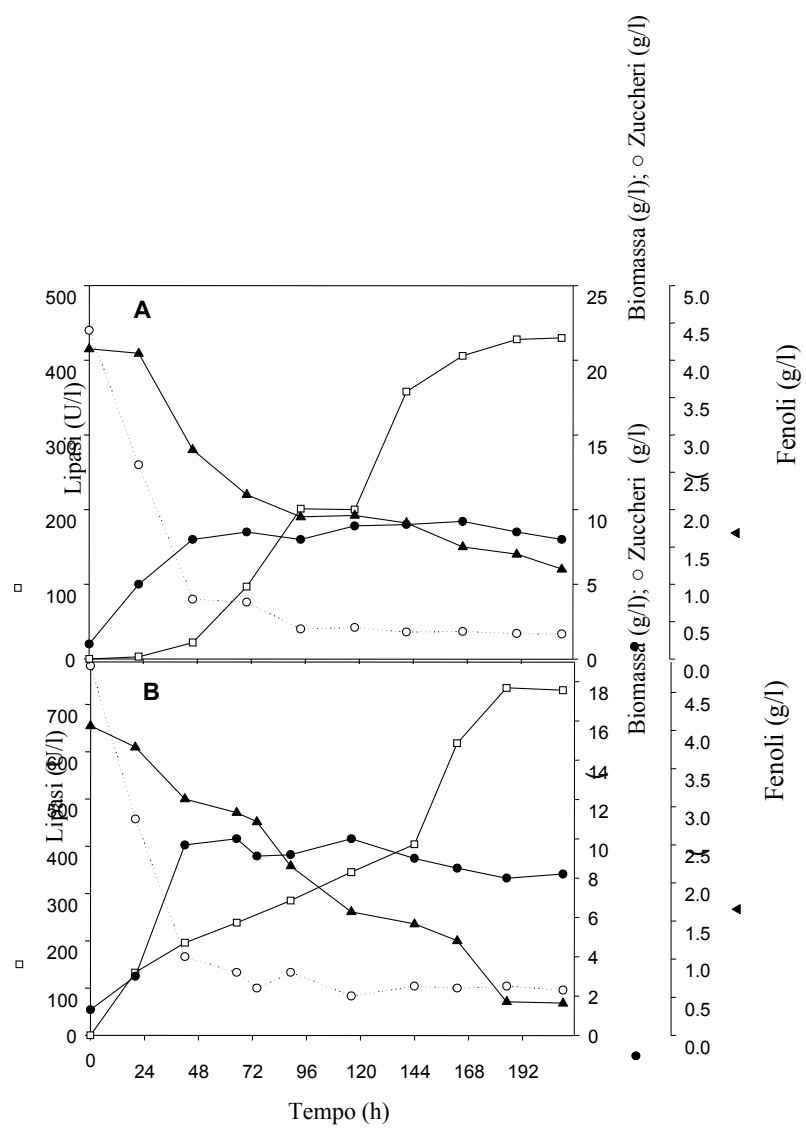


Figura 4.21 Cinetica di crescita e di produzione di lipasi da *P. citrinum* NRRL 1841 coltivato su AV5 a pH 6,15, addizionate di NH₄Cl (2,74 g/l) ed estratto di lievito (1,1 g/l), usando un reattore Air-lift (A) e un reattore STR (B). Sono riportate anche le concentrazioni di fenoli e zuccheri totali. I valori rappresentano le medie di due esperimenti indipendenti.

4.8 PRODUZIONE DI LIPASI DA *CANDIDA CYLINDRACEA* NRRL Y-17506 COLTIVATO SU UN TERRENO A BASE DI ACQUE DI VEGETAZIONE

Gli studi preliminari condotti nella fase iniziale di questa tesi di dottorato hanno messo in luce alcuni dati degni di attenzione relativi alla produzione di lipasi da microrganismi cresciuti su un terreno a base di acque reflue di frantoio, in particolare per il ceppo di *C. cylindracea*.

Durante lo screening tra vari microrganismi (Tabella 4.1), il lievito, già noto come migliore produttore di lipasi, si è messo subito in risalto, insieme al ceppo di *G. candidum*, come ottimo produttore (0,46 e 0,52 U/ml, rispettivamente per i due microrganismi) anche su un terreno a base di scarti agro-industriali. Inoltre, dai risultati ottenuti dai successivi studi tesi a valutare alcune condizioni colturali, sono state estrapolate informazioni molto interessanti. Differentemente da *P. citrinum* e *G. candidum*, la produzione di lipasi da *C. cylindracea* è stata influenzata in maniera significativa dal tipo di AV utilizzato come terreno (Figura 4.1), in particolare dal relativo contenuto zuccherino. Con questo lievito, la produzione più elevata si ottiene con AV caratterizzate da un basso contenuto di zuccheri totali (8,8 e 13,2 g/l) e di conseguenza da elevati rapporti COD/zuccheri (2,90 e 3,13). Per contro, la crescita cellulare è maggiore su AV con più elevati contenuti zuccherini (17,4 e 25,1 g/l). Dunque, la presenza di elevate quantità di zuccheri nel terreno favoriscono la crescita di *C. cylindracea*, ma reprimono la produzione di enzima. Questo risultato è in accordo con molti dati riportati in letteratura (Del Rio et al., 1990; Valero et al., 1991; Lotti et al., 1998; Dalmau et al., 2000). Dai risultati ottenuti si è potuto anche evincere che una elevata produzione di lipasi non è correlata ad una alta quantità di biomassa come è confermato dai valori di attività specifica (U/g di biomassa) ottenuti su AV3 e AV4, di circa 300 e 550 U/g rispettivamente, contro le 110 e 120 U/g raggiunte su AV2 e AV1 (Figura 4.2).

Durante la fase preliminare è stato anche osservato che l'aggiunta di olio (Figura 4.11), in particolare di olio di oliva, al terreno a base di AV permetteva di ottenere da *C. cylindracea* produzioni di lipasi molto elevate, fino a 9 U/ml contro poco più di 1,5 U/ml prodotte con il terreno di controllo integrato con NH_4Cl 2,4 g/l ed estratto di lievito 0,5 g/l ma privo di olio. Lo stesso effetto inducente non è stato invece osservato per gli altri ceppi in esame.

Fino ad oggi, produzioni, piuttosto elevate, di lipasi da *Candida* sono state ottenute solo con terreni colturali chimicamente definiti, processi fermentativi piuttosto complessi e

con ceppi immobilizzati o mutati (Benjamin & Pandey, 1996; Gordillo et al., 1998; Sanchez et al., 1999; Tan et al., 2003; Dominguez de Maria, 2005).

I livelli notevoli di attività lipolitica ottenuti mediante l'impiego di un terreno a basso costo rappresentano il motivo per cui *C. cylindracea* è stata selezionata tra i vari microrganismi per approfondirne lo studio sul comportamento fisiologico sia in beuta che in fermentatore da banco con lo scopo di ottimizzare al massimo la composizione del terreno e le condizioni colturali per la crescita del lievito e la produzione di enzima.

4.8.1 Scelta delle AV

La composizione delle acque di vegetazione è molto variabile e, come è stato già detto molte volte, dipende da molti fattori quali la cultivar, i volumi di acqua apportati durante la fase di gramolatura, il processo di estrazione, le condizioni meteorologiche durante il periodo di maturazione, il periodo di raccolta e in ultimo ma non meno importante il punto di prelievo delle AV (decanter o inferno) (Montedoro, 1986).

Per non sottovalutare questa variabilità e la sua influenza sulla produzione dell'enzima, durante questa tesi di dottorato si è cercato di utilizzare AV sempre diverse, provenienti da vari frantoi oppure prelevate durante campagne olearie diverse in modo da tener conto di tutte le fluttuazioni possibili. Dunque, prima di procedere all'ottimizzazione del terreno è stato condotto un esperimento finalizzato a valutare l'effetto del tipo di AV sulla produzione di lipasi da *C. cylindracea* con acque di vegetazione che finora non erano state prese ancora in esame per verificare nuovamente la capacità del ceppo di crescere su questo refluo e di produrre lipasi e per riconfermare i risultati precedentemente ottenuti. A tale scopo sono state prese in considerazione quattro tipi di AV, AV6, AV7, AV8 e AV9 (Tabella 3.1 e 3.2), due delle quali sono state utilizzate anche dopo diluizione 1:2 (AV7 e AV9). Il terreno a base di AV è stato integrato con NH_4Cl 2,4 g/l, estratto di lievito 0,5 g/l e prima della sterilizzazione il pH è stato portato a 6,1 con NaOH 1,0 M.

Come evidenziato dai dati riportati in Tabella 4.5, il lievito è cresciuto bene su tutte le tipologie di acque producendo lipasi e riconfermando i dati precedentemente ottenuti: le AV con contenuti di zuccheri totali più bassi sono più adatti per la produzione di enzimi lipolitici. Infatti, per quanto riguarda la produzione enzimatica, le AV di maggiore interesse sono risultate essere quelle diluite, AV7 (1:2) e AV9 (1:2), con un contenuto in zuccheri totali di 8,32 e 8,94 g/l rispettivamente. I livelli di attività ottenuti con queste due tipologie di AV, di 3,20 e 2,52 U/ml per AV7 (1:2) e AV9 (1:2)

rispettivamente, sono state più elevate di quelli raggiunti nella fase preliminare di studio con un terreno integrato nella stessa maniera ma a base di AV4 (1,5 U/ml); come si può vedere in Tabella 3.1, le AV4 sono acque di vegetazione prelevate dall'inferno, dove permangono per 3-4 giorni e dove possono andare incontro a processi microbici degradativi, a contaminazioni, a reazioni di polimerizzazione e altre modificazioni per esempio sulla componente grassa o sulla disponibilità di ioni metallici, compromettendo così in parte le caratteristiche importanti per la loro applicazione in processi fermentativi per la produzione di enzimi e in particolare nel caso in esame per la produzione di lipasi. Inoltre, si può vedere in Tabella 3.2 come il contenuto in olio residuo delle AV4 (0,4 g/l) sia più basso di quello delle AV7(1:2) e AV9 (1:2) (0,75 e 0,52 g/l, rispettivamente), ed è ben noto in letteratura l'effetto inducente di questa componente sulla produzione di lipasi (Valero et al., 1988 e 1990; del Rio et al., 1990; Benjamin & Pandey, 1996; Muralidhar et al., 2001).

In Figura 4.22 sono stati riportati gli andamenti nel tempo della produzione di lipasi, del contenuto in zuccheri e della crescita cellulare di *C. cylindracea* per le varie tipologie di AV. Come si può osservare si ha un veloce consumo degli zuccheri nelle prime 30 ore di fermentazione per tutti i casi in esame, eccetto per il terreno a base di AV8, dopodiché si raggiunge un plateau e gli zuccheri non sono ulteriormente utilizzati. Nello stesso lasso di tempo avviene una rapida crescita cellulare che poi si stabilizza al valore massimo in AV6, AV7 (1:2), AV8 e AV9 (1:2), mentre nelle altre due tipologie di AV (AV9 e AV7) il lievito continua lentamente a crescere. La comparsa di attività lipolitica si ha solo dopo che lo zucchero assimilabile è stato completamente esaurito. Questo fenomeno è in accordo con quanto già riportato da Macrae (1983) e con quanto riportato sul fatto che la sintesi inducibile di lipasi è inibita a livello trascrizionale dagli zuccheri (Lotti et al., 1998).

In Tabella 4.6 sono stati riportati i dati relativi all'abbattimento del carico organico, del contenuto in zuccheri totali e in fenoli totali; le AV7(1:2) e la AV9 (1:2) non hanno mostrato differenze rilevanti tra di loro.

Sulla base dei dati di produzione e di rimozione dei contaminanti si è deciso di utilizzare, per le successive prove, le AV7 (1:2).

4.8.2 Effetto dell'aggiunta di diverse concentrazioni di olio di oliva

La produzione di lipasi può essere influenzata da molti fattori, ma quello che può giocare un ruolo chiave nella sintesi non costitutiva di tale enzima è la presenza o meno

Tabella 4.5 Effetto della tipologia di acque di vegetazione (AV) sulla crescita e sulla produzione di lipasi da *C. cylindracea* NRRL Y-17506*.

AV	T _{max} # (h)	Lipasi (U/ml)	Produttività (U/ml h)	Produttività (U/g di biomassa)	Biomassa (g/l)
AV6	190	0,11±0,14 ^a	0,001±0,001 ^c	17±23 ^{bc}	6,07±1,34
AV7	163	1,81±0,11 ^{bd}	0,011±0,001 ^b	624±105 ^{ad}	5,76±0,34
AV7 (1:2)	190	3,20±0,24 ^c	0,017±0,003 ^{ab}	314±19 ^{abc}	5,13±0,71
AV8	89	1,71±0,09 ^d	0,019±0,001 ^a	330±18 ^{abc}	5,17±0,91
AV9	210	0,70±0,52 ^{ab}	0,003±0,002 ^c	222±166 ^c	3,16±1,07
AV9 (1:2)	113	2,52±0,43 ^{cd}	0,022±0,004 ^a	649±111 ^{ad}	3,88±1,25

* I valori, riportati come media±deviazione standard di esperimenti condotti in triplo, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica. I valori seguiti dallo stesso esponente non sono significativamente differenti, secondo il Tukey test ($p < 0,05$). La biomassa è riferita alla 210^a ora.

Tempo di fermentazione corrispondente al momento di massima produzione enzimatica.

Tabella 4.6 Abbattimento della componente organica da parte di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 cresciuta su diverse tipologie di AV*.

AV	Zuccheri total (g/l)	Fenoli totali (g/l)	COD (g/l)
AV6	12,00±0,28 (46,43)#	4,61±0,87 (12,81)	36,34±3,43 (55,92)
AV7	8,57±0,67 (42,89)	3,26±0,28 (26,74)	34,74±1,96 (43,43)
AV7 (1:2)	3,68±0,28 (64,58)	1,96±0,26 (20,83)	19,12±3,91 (48,18)
AV8	4,96±0,16 (22,0)	3,33±0,79 (31,27)	34,40±3,02 (27,41)
AV9	7,70±1,57 (55,75)	3,62±0,73 (23,79)	32,96±0,74 (42,67)
AV9 (1:2)	3,7±0,14 (60,81)	1,74±0,30 (16,35)	15,07±2,10 (48,32)

* I valori, riportati come media±deviazione standard, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica. Il COD è riferita alla 210^a ora.

In parentesi sono riportati i valori percentuali (%) di abbattimento rispetto al to.

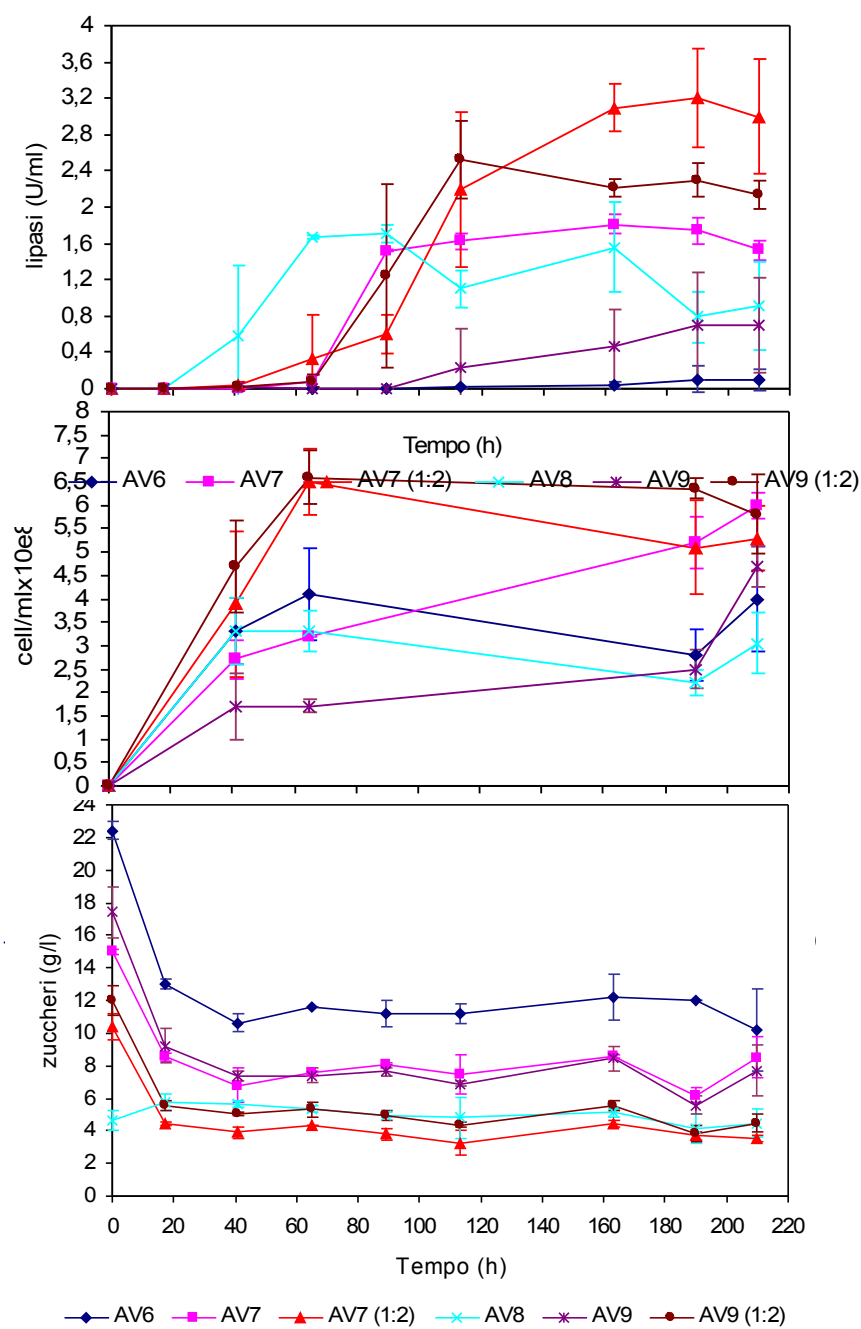


Figura 4.22 Andamento nel tempo della produzione di lipasi, della crescita cellulare e della rimozione di zuccheri totali da parte di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 sulle varie tipologie di AV in beuta.

di potenziali induttori e/o substrati (Macrae, 1983; Baillargeon et al., 1989; Pimentel et al., 1996; Pokorny et al., 1997). Alcuni autori hanno utilizzato oli in quantità tali da rappresentare sia la fonte di carbonio che l'induttore (Valero et al., 1988; Benjamin & Pandey, 1996; Corzo & Revah, 1999), mentre altri hanno studiato l'effetto di aggiunta di oli a basse concentrazioni come elemento induttore, in terreni colturali che contenevano fonti di carbonio diverse (Hegedus & Khachatourians, 1988).

Nella prima parte del presente lavoro di tesi, è stato valutato l'effetto di tre tipi di olio (olio di soia, di mais e di oliva), e per quanto riguarda la produzione di lipasi da *C. cylindracea* il migliore induttore era risultato l'olio di oliva.

Studi condotti su *C. rugosa* hanno messo in evidenza che la massima attività lipolitica si otteneva aggiungendo al mezzo di coltura, una concentrazione di 10 g/l di olio di oliva. A concentrazioni maggiori non c'era, invece, un incremento significativo della produzione (Benjamin & Pandey, 1996).

In questa fase di studio, l'effetto dell'aggiunta di olio di oliva sulla produzione di lipasi è stato indagato a varie concentrazioni, valutandone così, sia una possibile azione come fattore inducente (1 e 3 g/l), sia come substrato (5 e 10 g/l). Le quattro tesi sono state, inoltre, confrontate con una in cui non è stato aggiunto olio di oliva.

I risultati ottenuti (Tabella 4.7) hanno confermato l'influenza positiva che l'aggiunta di olio ha sulla produzione di lipasi. In particolare, aumentando l'aggiunta di olio nel mezzo fino a 3 g/l si ha un considerevole incremento dell'attività lipolitica e dell'attività specifica intesa come unità di attività riferite alla biomassa cellulare (U/numero di cellule). A concentrazioni superiori (5 e 10 g/l) non sono stati osservati aumenti statisticamente significativi né sulla produzione di lipasi né sull'attività specifica. Questo potrebbe essere in accordo con l'ipotesi che l'olio viene utilizzato dal lievito come induttore, e a questo scopo sono sufficienti 3 g/l, ma anche come fonte di carbonio dal momento che con 10 g/l la crescita cellulare è significativamente più alta.

Per quanto riguarda i livelli di produttività, la tesi con 3 g/l di olio di oliva è risultata più interessante (0,036 U/ml h) e con differenze statisticamente significative, rispetto a quella con 10 g/l (0,024 U/ml h).

Al contrario, la percentuale di rimozione degli zuccheri e del carico organico non è stato influenzato in modo significativo dall'aggiunta di olio. Tuttavia, la tesi con 5 g/l è risultata essere più efficiente nella rimozione dei fenoli totali (Tabella 4.8).

In Figura 4.23 è stato riportato l'andamento nel tempo del pH e della produzione di lipasi al variare della quantità di olio aggiunto. Come si può notare il pH iniziale di 6,1

Tabella 4.7 Effetto dell'aggiunta di olio di oliva sulla produzione di lipasi, sulla produttività e sulle crescita cellulare di *C. Cyindracea* NRRL Y-17506 su AV7 (1:2) in beuta*.

Olio (g/l)	Tmax# (ore)	Lipasi (U/ml)	Produttività (U/ml h)	Attività specifica (U/Cell)	Crescita (10 ⁸ Cell/ml)	pH#
0	72	0,87±0,14 ^b	0,012±0,002 ^c	0,19±0,03 ^c	4,49±0,52	8,0
1	72	3,60±0,36 ^c	0,050±0,005 ^d	0,52±0,05 ^b	6,91±0,08	7,5
3	264	9,48±0,45 ^a	0,036±0,002 ^a	1,48±0,05 ^a	6,39±0,03	7,0
5	312	7,85±1,05 ^a	0,025±0,003 ^{ab}	1,17±0,15 ^a	6,81±0,68	6,5
10	336	8,09±0,37 ^a	0,024±0,001 ^b	0,08±0,04 ^b	10,11±0,39	7,0

* I valori, riportati come media±deviazione standard di esperimenti condotti in triplo, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica. I valori seguiti dallo stesso esponente non sono significativamente differenti, secondo il Tukey test ($p < 0,05$).

Tempo di fermentazione e pH corrispondenti al momento di massima produzione enzimatica.

Tabella 4.8 Effetto dell'aggiunta di olio di oliva sull'abbattimento della componente organica da parte di *C. Cyindracea* NRRL Y-17506 cresciuta su AV7 (1:2) in beuta*.

Olio (g/l)	Zuccheri totali (g/l)	Fenoli totali (g/l)	COD (g/l)
0	3,65±0,07 (61,33)	1,89±0,04 (9,13)	18,25±0,74 (29,35)
1	3,80±0,28 (59,75)	2,23±0,49 (0,0)	17,79±0,0 (32,79)
3	3,55±0,35 (62,39)	1,69±0,09 (18,75)	18,70±0,70 (35,87)
5	3,4±0,33 (62,56)	1,98±0,11 (30,28)	17,22±0,70 (36,11)
10	4,30±0,14 (54,45)	2,18±0,01 (0,0)	18,70±(0,0) (37,53)

* I valori, riportati come media±deviazione standard, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica. Il COD è riferita alla 210^a ora.

In parentesi sono riportati i valori percentuali (%) di abbattimento rispetto al to.

diminuisce per poi risalire in corrispondenza del massimo di attività per tutte le tesi in esame. Il valore minimo di pH raggiunto nel mezzo decresceva all'aumentare della quantità di olio aggiunto ed ha raggiunto 4,25 quando sono stati aggiunti 10 g/l di olio. Inoltre, il tempo necessario all'innalzamento del pH è aumentato all'aumentare della concentrazione di olio di oliva. L'ipotesi è che man mano che l'olio viene idrolizzato, da parte degli enzimi lipolitici costitutivi, si liberano glicerolo e acidi grassi. Questi ultimi sono responsabili dell'abbassamento del pH, tanto più marcato quanto maggiore è la loro concentrazione. Quando, successivamente, gli acidi grassi sono utilizzati da *C. Cylindracea*, il pH torna a salire, seguendo una evoluzione che è in linea con quanto descritto da altri autori per altri ceppi microbici (Valero et al., 1988; Del Rio et al., 1990, Corzo & Revah, 1999). Dal grafico si osserva anche come la comparsa più marcata di lipasi si ha a bassi valori di pH, cioè, solo quando gli acidi grassi sono liberi e possono svolgere il loro effetto inducente. Per tutte le tesi, il massimo di produzione si ha quando il pH è in risalita per poi cominciare più o meno velocemente a diminuire, in corrispondenza di valori di pH compresi tra 7 e 8. Su questa base è possibile ipotizzare che valori di pH piuttosto basici possano determinare la denaturazione dell'enzima (Lopez et al., 2000; Tan et al., 2003; Burkert et al. 2005).

4.8.4 Effetto del Tween 80

E' noto che i Tween abbiano un effetto emulsionante nei confronti degli oli, aumentandone la solubilità e, conseguentemente, massimizzando l'eventuale effetto inducente nei confronti delle attività lipolitiche. I Tween, inoltre, per la loro omologia di struttura sono anche usati come induttori e fonti di carbonio per la produzione di lipasi (Lotti et al., 2001; Dominguez de Maria, 2002 e 2005; Akoh et al., 2004). Ad esempio, alcuni terreni di coltura utilizzati per l'effettuazione di screening di microrganismi lipolitici prevedono la presenza dei diversi tipi di Tween come unica fonte di carbonio (Petrucchioli et al., 1988; Petrucchioli & Gallo Federici, 1992). Infine, alla stregua di altri tensioattivi, quali ad esempio il Triton X-100, i Tween si sono dimostrati, talvolta, in grado di aumentare la permeabilità della membrana cellulare, favorendo il rilascio degli enzimi all'esterno della cellula. Ad esempio, Dalmau et al. (2000) e Corzo & Revah (1999) hanno descritto in *C. rugosa* e *Yarrowia lipolytica*, rispettivamente, l'effetto positivo dell'aggiunta di Tween 80 sulla produzione di lipasi.

Considerando che le AV contengono un residuo di olio e che, comunque, a queste sono stati aggiunti 3 g/l di olio, è sembrato molto interessante valutare se la presenza di

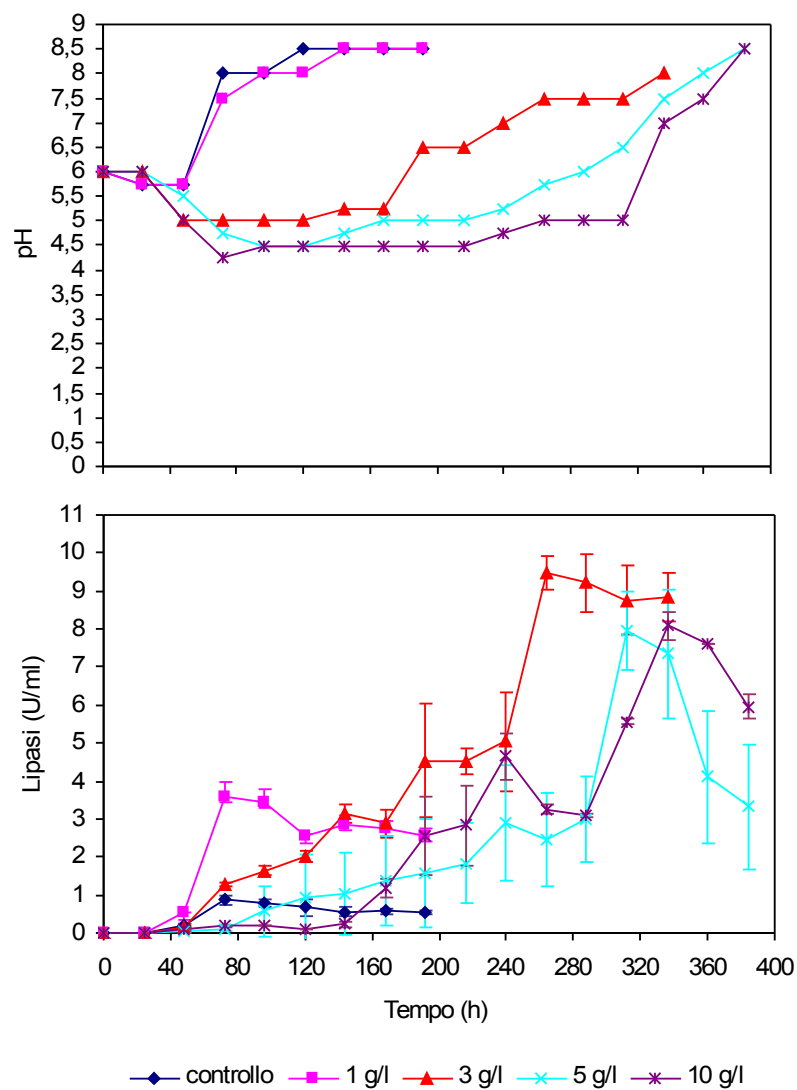


Figura 4.23 Andamento nel tempo del pH e della produzione di lipasi da *C. cylindracea* NRRL Y-17506 cresciuta in beuta su AV7 (1:2) con diverse concentrazioni di olio di oliva aggiunto (0, 1, 3, 5 e 10 g/l).

Tween 80 avesse un effetto positivo sulla solubilizzazione dell'olio e sull'aumento dell'effetto di induzione di attività lipolitiche. A questo scopo, è stato valutato comparativamente l'effetto dell'aggiunta di Tween 80 (0,5 g/l) al terreno di base (AV7 dil 1:2, NH₄Cl 2,4 g/l, olio di oliva 3 g/l ed estratto di lievito 0,5 g/l) (Tabella 4.9).

L'aggiunta di Tween 80 ha interferito sulla produzione di lipasi: l'attività massima ottenuta, infatti, è stata nettamente inferiore (4,29 U/ml) rispetto a quanto ottenuto con AV prive di Tween (9,48 U/ml). Evidentemente, l'effetto emulsionante dell'olio è stato controbilanciato da un significativo effetto negativo nei confronti della crescita microbica (Tabella 4.9). Per altri microrganismi, quali *Baeuveria bassiana* (Hegedus & Khachatouriaus, 1988) e *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Lin et al., 1995), è infatti stata descritta una significativa riduzione della produzione di lipasi a seguito dell'aggiunta di Tween. E' noto, inoltre, che in microrganismi particolarmente sensibili, i Tween possono avere un'azione inibente sulla crescita, conseguente ad una eccessiva permeabilizzazione della membrana citoplasmatica (Petruccioli et al., 1999).

L'aggiunta di Tween 80, infine, non sembra avere influito sulla rimozione dei fenoli, degli zuccheri e del carico organico (Tabella 4.10).

4.8.5 Effetto dell'aggiunta di glucosio

In numerosi lavori, è stato studiato l'effetto di differenti fonti di carbonio, alternative agli oli, nella produzione di lipasi da funghi e lieviti (Valero et al., 1991; Dalmau et al., 2000; Muralidhar et al., 2001). E' noto che la concentrazione ed il tipo di zuccheri presenti nel mezzo di produzione possono avere un peso determinante senza, tuttavia, fornire una risposta univoca nei confronti della produzione di enzimi lipolitici. *G. candidum* inizia a sintetizzare lipasi solo dopo completa utilizzazione del glucosio nel mezzo colturale (Macrae, 1983); anche per *C. paralipolytica* ed *A. terreus* è stato descritto un comportamento simile (Sugiura & Isobe, 1975; Macris et al., 1996). Al contrario, le produzioni da ceppi appartenenti a varie specie di *Rhizopus* non sono particolarmente influenzate dal tipo di fonte di carbonio e le produzioni sono ottenute anche su glucosio (Espinosa et al., 1990; Elibol & Ozer, 2000).

Nel presente lavoro si è studiato l'effetto dell'aggiunta di glucosio al terreno colturale a base di AV addizionandolo ad una concentrazione pari a 5 g/l. Questo effetto è stato, inoltre, valutato in presenza e/o assenza di olio di oliva.

L'aggiunta di glucosio ha inibito fortemente l'attività lipolitica che è stata, comunque influenzata, in modo statisticamente significativo, dalla presenza o meno di olio

Tabella 4.9 Effetto dell'aggiunta di Tween 80 (0,5 g/l) sulla crescita e sulla produzione di lipasi da *C. cylindracea* NRRL Y-17506 coltivata in beuta su AV7 (1:2)*.

Tween80	Tmax# (ore)	Lipasi (U/ml)	Produttività (U/ml h)	Crescita (10⁸ Cell/ml)	pH#
Assente	264	9,48±0,45 ^a	0,036±0,002 ^a	6,39±0,03	7±0,0
Presente	264	4,29±0,30 ^b	0,016±0,004 ^b	4,87±0,29	7,25±0,25

* I valori, riportati come media±deviazione standard di esperimenti condotti in triplo, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica. I valori seguiti dallo stesso esponente non sono significativamente differenti, secondo il Tukey test ($p < 0,05$).

Tempo di fermentazione e pH corrispondenti al momento di massima produzione enzimatica.

Tabella 4.10 Effetto dell'aggiunta di Tween 80 sull'abbattimento della componente organica da parte di *C. Cylindracea* NRRL Y-17506 cresciuta in beuta su AV7 (1:2)*.

Tween 80	Zuccheri totali (g/l)	Fenoli totali (g/l)	COD (g/l)
Assente	3,55±0,35 (62,39)#	1,69±0,09 (18,75)	18,70±0,70 (35,87)
Presente	3,70±0,14 (60,81)	1,74±0,30 (16,35)	15,07±2,10 (48,32)

* I valori, riportati come media±deviazione standard, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica

In parentesi sono riportati i valori percentuali (%) di abbattimento rispetto al to.

aggiunto (Tabella 4.11).

Nella tesi in cui è stato aggiunto solo glucosio è stata ottenuta una attività massima di 0,62 U/ml, con una riduzione dei tempi di fermentazione ($T_{\max}$ 192 ore) dovuta alla rapidità con la quale il glucosio, unica fonte aggiuntiva di carbonio, veniva metabolizzato dal microrganismo.

Al contrario, nella tesi in cui glucosio e olio erano entrambi presenti, l'attività è stata di 6,45 U/ml, con tempi di fermentazione molto più lunghi ($T_{\max}$ 336 ore). Quest'ultima osservazione suggerisce, ancora una volta, come l'olio abbia un ruolo fondamentale nell'induzione della produzione di lipasi.

Infine, se si confronta la produzione di lipasi nella tesi con olio e glucosio con quella in cui è presente solo olio (6,45 vs 9,48 U/ml, rispettivamente) si notano, invece, gli effetti di ritardo e di repressione del glucosio sulla produzione dell'enzima. Sia la produttività oraria che l'attività specifica sono state significativamente più elevate nel caso in cui nel terreno di produzione era presente solo olio (Tabella 4.11).

I risultati ottenuti sembrano in ogni caso in linea con quanto osservato da alcuni autori i quali concludono che il glucosio è, tra le varie fonti di carbonio, quello meno adatto a supportare la produzione di lipasi (Valero et al., 1991; Dalmau et al., 2000; Muralidhar et al., 2001).

Per quanto riguarda l'abbattimento degli zuccheri e dei fenoli, i valori ottenuti non sono stati particolarmente interessanti, mentre una percentuale di rimozione del carico organico, notevolmente più alta, è stata osservata per la tesi contenente solo glucosio (74,59%) (Tabella 4.12).

4.8.6 Effetto dell'aggiunta di diversi fattori di crescita

Come ultimo approccio nell'ottimizzazione della composizione del terreno a base di acque di vegetazione per la produzione di lipasi da *C. cylindracea* NRRL Y-17506, si è cercato di valutare l'effetto dell'aggiunta di differenti principi di crescita complessi quali, l'estratto di lievito, l'estratto di malto ed il peptone.

Questi tre componenti complessi sono stati utilizzati nella definizione dei terreni di coltura per la produzione di lipasi dallo stesso ceppo di *C. cylindracea* (Muralidhar et al., 2001) e da *C. rugosa* DSM 2031 (Benjamin & Pandey, 1996). È importante sottolineare, tuttavia, che in questi casi i terreni colturali di base erano mezzi a composizione definita e non reflui. Conseguentemente, lo studio dell'influenza dei tre substrati complessi aggiunti alle AV potrebbe avere nel nostro caso effetti

Tabella 4.11 Effetto dell'aggiunta di glucosio (5 g/l), e/o aggiunta di olio (3 g/l) sulla produzione di lipasi e sulla crescita di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 su AV7 (1:2) in beuta*.

Aggiunte	Tmax	Lipasi	Produttività	Crescita	Attività Specifica	PH#
	(ore)	(U/ml)	(U/ml h)	(10 ⁸ Cell/ml)	(U/Cell)	
Olio (+)	264	9,48±0,45 ^a	0,036±0,002 ^a	6,39±0,03	1,28±0,12 ^a	7,0±0,0
Glucosio (-)						
Olio (+)	336	6,45±0,64 ^b	0,019±0,002 ^b	6,76±0,03	0,95±0,00 ^b	7,5±0,0
Glucosio (+)						
Olio (-)	192	0,62±0,14 ^c	0,003±0,001 ^c	5,55±0,23	0,11±0,00 ^c	8,0±0,0
Glucosio (+)						

* I valori, riportati come media±deviazione standard di esperimenti condotti in triplo, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica. I valori seguiti dallo stesso esponente non sono significativamente differenti, secondo il Tukey test ($p < 0,05$).

Tempo di fermentazione e pH corrispondenti al momento di massima produzione enzimatica.

Tabella 4.12 Effetto dell'aggiunta di glucosio (5 g/l), e/o olio di oliva (3 g/l) sull'abbattimento della componente organica da parte di *C. Cylindracea* NRRL Y-17506 cresciuta su AV7 (1:2) in beuta*.

Aggiunte	Zuccheri totali	Fenoli totali	COD
	(g/l)	(g/l)	(g/l)
Olio (+)	3,55±0,35	1,69±0,09	18,70±0,70
Glucosio (-)	(62,39)#	(18,75)	(35,87)
Olio (+)	3,10±0,00	1,62±0,06	20,36±3,36
Glucosio (+)	(76,87)	(22,12)	(33,85)
Olio (-)	3,80±0,28	1,57±0,07	7,10±0,00
Glucosio (+)	(71,64)	(24,52)	(74,59)

* I valori, riportati come media±deviazione standard, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica

In parentesi sono riportati i valori percentuali (%) di abbattimento rispetto al to.

sostanzialmente diversi rispetto a quanto descritto dai sopracitati autori.

Oltre alla tesi in cui i tre substrati complessi sono stati aggiunti singolarmente al mezzo, è stato studiato anche il loro effetto combinato. Come controllo è stata condotta una fermentazione in cui non è stato aggiunto nessun fattore di crescita complesso ma solo olio di oliva e cloruro di ammonio, come fonte azotata inorganica.

Dai risultati riportati in Tabella 4.13, si può notare come, ad eccezione dei casi in cui era presente l'estratto di malto, non ci sono state differenze statisticamente significative nei livelli di produzione di lipasi tra le varie tesi. Anche le produttività sono risultate simili tra loro.

L'aggiunta di estratto di malto ha influenzato negativamente la produzione enzimatica, pur garantendo una crescita cellulare simile a quella delle altre tesi. Questo può essere spiegato dal fatto che, l'estratto di malto, contenendo una componente zuccherina, il maltosio, potrebbe aver inibito la produzione di lipasi con un effetto simile a quello osservato in presenza di glucosio.

Per quanto riguarda i livelli di rimozione degli zuccheri totali e del carico organico, non sono stati osservati valori particolarmente interessanti, mentre per i fenoli totali è stata notata una percentuale di abbattimento notevolmente maggiore nella tesi contenente solo estratto di lievito e in quella contenente tutti e tre i principi di crescita (18,75 e 21,15 %, rispettivamente) (Tabella 4.14).

4.8.7 Effetto della velocità di agitazione e delle condizioni di aerazione in beuta

Una delle condizioni colturali che normalmente influenzano in modo significativo le produzioni enzimatiche è l'aerazione/agitazione del mezzo colturale. Alcune idrolasi, come ad esempio le pectinasi, vengono meglio prodotte a bassi livelli di aerazione (Wimborne & Rickard, 1978), anche se in fase di ottimizzazione dei relativi processi fermentativi spesso si preferisce fornire elevati livelli di aerazione durante le prime ore di fermentazione, per garantire un buon sviluppo cellulare, e poi ridurre in modo scalare l'aerazione così da favorire la successiva fase di produzione enzimatica (Federici & Petruccioli, 1985). Molte ossidasi, al contrario, vengono indotte dalla presenza di ossigeno (Witteveen et al., 1990) e quindi da alti livelli di aerazione. Tuttavia, nell'ambito di ciascuna produzione enzimatica è impossibile generalizzare a causa della diversità fisiologica che esiste fra specie diverse ed anche fra ceppi appartenenti ad una stessa specie (Petruccioli & Federici, 1988). Le risposte riguardo l'effetto dell'aerazione e della velocità di agitazione nei confronti della produzione di lipasi non sono univoche

Tabella 4.13 Effetto dell'aggiunta di diversi fattori di crescita (FI) sulla produzione di lipasi e sulla crescita in beuta di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 su AV7 (1:2)*.

FI [§]	T _{max} (ore)#	Lipasi (U/ml)	Produttività (U/ml h)	Crescita (10 ⁸ Cell/ml)	PH#
Controllo	264	8,74±0,06 ^a	0,033±0,000 ^a	6,11±0,16	6,50±0,71
EY	264	9,48±0,45 ^a	0,036±0,002 ^a	6,39±0,03	7,00±0,00
EM	264	6,19±0,65 ^b	0,023±0,004 ^b	6,04±0,62	7,00±0,00
P	264	9,25±0,49 ^a	0,035±0,002 ^a	6,11±0,16	6,50±0,00
EY+EM	240	8,29±0,49 ^{da}	0,035±0,002 ^a	6,12±0,36	6,50±0,00
EY+P	240	9,20±0,60 ^a	0,038±0,004 ^a	7,35±0,70	6,75±0,35
EM+P	240	6,99±0,50 ^{db}	0,029±0,005 ^a	6,00±0,47	7,00±0,71
EY+EM+P	168	4,77±0,60 ^c	0,028±0,007 ^{ba}	6,30±0,62	7,00±0,00

* I valori, riportati come media±deviazione standard di esperimenti condotti in triplo, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica. I valori seguiti dallo stesso esponente non sono significativamente differenti, secondo il Tukey test (p < 0,05).

Tempo di fermentazione e pH corrispondenti al momento di massima produzione enzimatica.

§ EY, estratto di lievito (0,5 g/l); EM, estratto di malto (1,0 g/l); P, peptone (1,0 g/l).

Nelle combinazioni sono state mantenute, per ciascuno, le stesse concentrazioni.

Tabella 4.14 Effetto dell'aggiunta di diversi fattori di crescita (FI) sull'abbattimento della componente organica da parte di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 cresciuta in beuta su AV7 (1:2)*.

FI [§]	Zuccheri totali (g/l)	Fenoli totali (g/l)	COD (g/l)
Controllo	3,00±0,42 (68,22)#	1,94±0,21 (6,73)	17,50±0,00 (39,99)
EY	3,55±0,35 (62,39)	1,69±0,09 (18,75)	18,70±0,70 (35,87)
EM	4,35±0,07 (53,92)	1,86±0,02 (20,58)	18,78±1,39 (35,60)
P	3,55±0,07 (62,39)	1,99±0,12 (4,33)	19,15±1,34 (34,33)
EY+EM	4,40±0,14 (53,39)	2,00±0,16 (3,85)	20,10±0,00 (31,07)
EY+P	3,45±0,35 (63,45)	1,85±0,06 (11,06)	18,20±0,00 (37,59)
EM+P	4,30±0,28 (54,45)	1,91±0,29 (8,17)	20,22±0,64 (30,66)
EY+EM+P	3,55±1,34 (62,39)	1,64±0,28 (21,15)	19,76±0,00 (32,24)

* I valori, riportati come media±deviazione standard, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica

In parentesi sono riportati i valori percentuali (%) di abbattimento rispetto al to.

§ EY, estratto di lievito (0,5 g/l); EM, estratto di malto (1,0 g/l); P, peptone (1,0 g/l).

Nelle combinazioni sono state mantenute, per ciascuno, le stesse concentrazioni.

e sembrano dipendere dalla specie microbica: per ceppi di *Rhodotorula glutinis* (Papaparaskevas et al., 1992), *Calvatia gigantea* (Christakopoulos et al., 1992), *Yarrowia lipolytica* (Corzo & Revah, 1999), *G. candidum* (Baillargeon et al., 1989), *A. niger* (Macris et al., 1996), e *R. arrhizus* (Elibol & Ozer, 2000) è descritta una produzione sotto condizioni di elevata aerazione, mentre ceppi di *P. citrinum* (Pimentel et al., 1996; Miranda et al., 1999) producono bene a basso regime di giri e, conseguentemente, di aerazione.

Per quanto riguarda la produzione di lipasi dal genere *Candida*, in particolare da *C. rugosa*, sono stati condotti molti studi relativi alle condizioni di aerazione e di agitazione, soprattutto in bioreattore. I risultati ottenuti hanno messo in luce che la presenza di aria è essenziale per la produzione di lipasi da questo lievito: in particolare, l'aumento della concentrazione di ossigeno disciolto nel mezzo, come conseguenza dell'incremento della velocità di agitazione, porta ad un significativo aumento della produttività, definita come la pendenza della retta che congiunge l'origine al punto di massima attività lipolitica nella cinetica di produzione (Chen et al., 1998, Tan et al., 2003; Puthli et al., 2006). Per contro, un eccessivo aumento della velocità di agitazione sembra sortire un effetto di stress portando alla denaturazione dell'enzima con conseguente diminuzione della produzione finale. Studi sulla stabilità degli enzimi lipolitici, prodotti da *C. rugosa*, a diverse velocità di agitazione, sono stati condotti da diversi autori portando, tuttavia, anche in questo caso a risultati discordanti (Lee e Choo, 1989; Gordillo et al., 1995).

A causa di questa ampia variabilità di risposta nei lavori riportati in bibliografia, è sembrato molto importante indagare, seppur con un approccio molto preliminare, l'effetto della velocità di agitazione e delle condizioni di aerazione per la produzione di lipasi da *C. cylindracea* NRRL Y-17506 in beuta. Nelle prove condotte fino ad ora, è stata scelta come condizione colturale standard l'uso di beute flangiate con un duplice scopo: determinare livelli di aerazione piuttosto elevati e, soprattutto, garantire una buona emulsione dell'olio residuo presente nelle AV e dell'olio aggiunto come possibile fattore inducente. Più precisamente, sono state utilizzate beute da 250 ml con una singola flangia, contenenti 50 ml di brodo ed incubate ad una velocità di agitazione pari a 180 giri/min.

Nell'ottica di ottenere informazioni maggiori sull'influenza dell'aerazione/agitazione sono stati condotti una nuova serie di esperimenti: un esperimento in cui le beute sono state incubate a 250 giri/min, per valutare l'effetto della velocità di agitazione, e un altro

nel quale è stato studiato l'effetto dell'aerazione usando beute flangiate e non-flangiate e due diversi rapporti volume beuta/volume terreno (beute flangiate e non da 250 ml contenenti 50 ml di terreno e beute flangiate e non da 500 ml sempre con 50 ml di terreno). I diversi rapporti volume beuta/volume terreno determinano una diversa ampiezza della superficie di interscambio tra la fase liquida (brodo) e la fase gassosa (aria sovrastante) e quindi un diverso scambio di ossigeno che è maggiore nel caso di superfici maggiori.

Nella Tabella 4.15 sono riportati i risultati per la produzione di lipasi, la produttività e la crescita cellulare ottenuti al variare delle condizioni di aerazione e agitazione da parte di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 cresciuta sul terreno a base di AV ottimizzato. L'effetto delle diverse condizioni è stato molto limitato. Ad eccezione della tesi 2 (in cui le beute sono state incubate a 250 giri/min), non sono state notate differenze statisticamente significative per nessuna delle tre risposte (attività, produttività e crescita cellulare) prese in esame. Nel caso dell'esperimento 2 l'attività lipolitica è stata rilevata solo in tracce; questo, tuttavia, non sembra dipendere da un effetto di denaturazione dell'enzima, conseguente all'incremento della velocità di agitazione, ma, piuttosto, alla limitata crescita cellulare che, evidentemente, è influenzata negativamente dagli elevati regimi di giri.

Per quanto riguarda l'abbattimento del carico organico e del contenuto zuccherino (Tabella 4.16), non sono state notate differenze per le varie tesi, fatta eccezione per il caso 2. La riduzione della componente fenolica, invece, è stata più efficiente in condizioni di maggiore aerazione (beute flangiate e minore rapporto volume beuta/volume brodo).

4.8.8 Produzione di lipasi da *C. cylindracea* coltivata sul terreno ottimizzato a base di AV in bioreattore ad agitazione meccanica (stirrer tank reactor, STR)

Sulla base delle prove condotte in coltura agitata al fine di massimizzare la produzione di lipasi (studio dell'effetto della la tipologia di AV, della fonte di carbonio e di azoto, dell'aggiunta di induttori e di vari fattori di crescita), la composizione del terreno a base di AV ottimale per *C. cylindracea* è stata la seguente:

- AV7 diluite 1:2
- 2,4 g/l di NH_4Cl
- 0,5 g/l di Estratto di lievito

Tabella 4.15 Effetto agitazione/aerazione sulla produzione di lipasi e sulla crescita di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 in beuta su AV7 (1:2)*.

Tesi	T _{max} (ore)#	Lipasi (U/ml)	Produttività (U/ml h)	Crescita (10 ⁸ Cell/ml)
1 [§]	264	9,54±0,45 ^a	0,036±0,002 ^a	6,39±0,03 ^a
2 [§]	120	0,091±0,03 ^b	0,0008±0,0003 ^b	1,74±0,04 ^c
3 [§]	216	10,18±0,81 ^a	0,048±0,004 ^a	6,52±0,73 ^a
4 [§]	192	8,48±2,35 ^a	0,044±0,012 ^a	4,94±0,21 ^b
5 [§]	192	10,14±0,11 ^a	0,053±0,0005 ^a	5,47±0,18 ^{ab}

* I valori, riportati come media±deviazione standard di esperimenti condotti in triplo, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica. I valori seguiti dallo stesso esponente non sono significativamente differenti, secondo il Tukey test ($p < 0,05$).

Tempo di fermentazione corrispondente al momento di massima produzione enzimatica.

§1, beuta flangiata 250 ml a 180 giri/min

2, beuta flangiata 250ml a 250 giri/min

3, beuta non flangiata 250 ml a 180 giri/min

4, beuta flangiata 500 ml a 180 giri/min

5, beuta non flangiata 500 ml a 180 giri/min

Il volume del brodo per tutte le tesi è stato di 50 ml.

Tabella 4.16 Effetto agitazione/aerazione sull'abbattimento della componente organica da parte di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 cresciuta in beuta su AV7 (1:2)*.

Tesi	Zuccheri totali (g/l)	Fenoli totali (g/l)	COD (g/l)
1 [§]	3,55±0,35 (62,39)#	1,69±0,09 (18,75)	18,70±0,70 (35,87)
2 [§]	8,75±0,21 (0)	2,54±0,12 (15,92)	32,70±2,15 (4,44)
3 [§]	3,35±0,21 (58,64)	2,09±0,004 (19,34)	22,33±1,56 (34,22)
4 [§]	3,4±0,00 (58,02)	0,79±0,04 (68,21)	19,32±0,79 (44,09)
5 [§]	3,2±0,14 (59,49)	0,84±0,06 (66,40)	18,62±1,49 (43,41)

* I valori, riportati come media±deviazione standard, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica

In parentesi sono riportati i valori percentuali (%) di abbattimento rispetto al to.

§1, beuta flangiata 250 ml a 180 giri/min

2, beuta flangiata 250ml a 250 giri/min

3, beuta non flangiata 250 ml a 180 giri/min

4, beuta flangiata 500 ml a 180 giri/min

5, beuta non flangiata 500 ml a 180 giri/min

Il volume del brodo per tutte le tesi è stato di 50 ml.

- 3,0 g/l di olio di oliva

non sono stati aggiunti né Tween 80 né glucosio.

Il terreno colturale a base di AV così supplementato è stato impiegato per cercare di ottimizzare ulteriormente le condizioni colturali quali pH e agitazione/aerazione e per valutare la fattibilità tecnica del trasferimento di scala del processo dalla beuta al fermentatore da banco.

La produzione di lipasi da *C. cylindracea* a livello di fermentatore è stata studiata da molti autori e, in tutti i casi, è stato utilizzato un bioreattore ad agitazione meccanica (Valero et al., 1988 e 1991; Lee & Choo, 1989; Montesinos et al., 1993; Gordillo et al., 1995 e 1998; Dalmau et al., 1998 e 2000; Sanchez et al., 1999; Dominguez de Maria et al., 2005; Puthli et al., 2006). Anche nel presente studio il trasferimento di scala del processo è stato effettuato utilizzando reattori STR da banco, per due motivi: in primo luogo per poter confrontare i risultati ottenuti producendo lipasi da questo lievito su un terreno a base di AV con quelli raggiunti con terreni chimicamente definiti quali quelli utilizzati nei lavori sopraccitati; in secondo luogo perché l'attività sperimentale condotta su *P. citrinum* aveva già evidenziato come la produzione di lipasi in reattore ad agitazione pneumatica (Airlift) non fosse favorita.

Con lo scopo di migliorare la produzione enzimatica sul terreno a base di AV ottimizzato, sono stati esaminati alcune condizioni colturali quali il pH e la velocità di agitazione.

Effetto del pH sulla produzione di lipasi da *C. cylindracea*

Nei vari lavori riportati in bibliografia relativi alla produzione di lipasi da *C. cylindracea* in bioreattore, gli studi sull'ottimizzazione delle condizioni colturali sono stati condotti soprattutto in regime di pH controllato a valori di 6,2 e 6,3 (Valero et al., 1991; Gordillo et al., 1995; Montesinos et al., 1996; Dalmau et al., 1998 e 2000; Sanchez et al., 1999; Dominguez de Maria et al., 2005). In alcune sperimentazioni invece questo parametro è stato lasciato libero di variare nel corso della fermentazione (Valero et al., 1988; Obradors et al., 1993). Nel lavoro di Valero et al. (1988), in cui *C. rugosa* è stata cresciuta su un terreno contenente olio di oliva, è stato riportato che il pH iniziale di 6,1 scende fino a un minimo di 3 per poi risalire a pH più alcalini alla fine della fermentazione. Lo stesso andamento del pH è stato osservato anche nel corso di questa tesi di dottorato (Paragrafo 4.8.2 e Figura 4.23); in aggiunta è stato anche notato che dopo il raggiungimento del picco massimo di attività lipolitica, questa subisce un

decremento. La fase di diminuzione è coincisa con l'aumento del pH del mezzo di produzione a valori superiori a 7,0 e di conseguenza è stato ipotizzato che l'enzima potesse essere denaturato in ambienti alcalini. Quest'ultima affermazione è in accordo con i dati riportati da Tan et al. (2003): gli autori hanno concluso, infatti, che l'intervallo di pH ottimale per la produzione di lipasi è tra 5,8 e 7,0, mentre a valori di pH più acidi e più basici l'attività lipolitica è nettamente inferiore. Gli stessi riportano, in particolare, che tra 5,8 e 7,0 la produzione raggiunge livelli massimi di 4000-4200 U/ml, mentre a pH 8,0 e 9,0 arriva fino a 2500 e 1600 U/ml, rispettivamente.

Di conseguenza, per valutare l'effetto del pH sulla produzione di lipasi da *C. cylindracea* coltivata sul terreno a base di AV ottimizzato sono state confrontate tre condizioni: pH libero, pH controllato ad un valore costante di 6,5 mediante l'aggiunta di HCl 4,0 M e NaOH 4,0 M e, infine, pH mantenuto a valori inferiore a 6,5 con l'aggiunta di HCl 4,0 M.

In Tabella 4.17 sono stati riportati i valori massimi ottenuti per la produzione di lipasi, la produttività e la crescita del lievito valutata in termini di biomassa. Per quanto riguarda le tesi a pH non controllato e a pH inferiore a 6,5, la massima attività enzimatica ($18,70 \pm 0,94$ e $20,39 \pm 0,47$ U/ml, rispettivamente) è stata simile ed è stata raggiunta nello stesso tempo. Nel caso in cui il pH è stato mantenuto ad un valore costante di 6,5, nonostante la biomassa prodotta sia stata superiore a quella ottenuta nelle altre due tesi, la produzione lipolitica massima ($1,77 \pm 0,06$ U/ml) è stata molto più bassa. Questo risultato potrebbe essere dovuto al fatto che mantenendo il pH fisso ad un valore vicino alla neutralità, gli acidi grassi liberati dall'idrolisi dell'olio non rimangono in forma dissociata nel terreno di produzione ma si legano ad altri ioni e, di conseguenza, non possono svolgere il loro effetto inducente.

Un'altra osservazione che può essere fatta in base ai risultati ottenuti (Figura 4.24) è che la diminuzione di attività osservata dopo il picco massimo non è legata all'aumento del pH a valori superiori a 7, come è stato precedentemente supposto, dal momento che questo andamento è stato osservato per tutte e tre le tesi in esame.

In Figura 4.25 è riportato l'andamento nel tempo del carico organico del mezzo e della biomassa di *C. cylindracea* per la tesi in cui il pH non viene controllato. Si può notare come sia il contenuto zuccherino che il COD diminuiscono molto velocemente nelle prime 24 ore ad un valore che rimane più o meno costante nelle ore successive; nello stesso intervallo di tempo la biomassa raggiunge il suo valore massimo. Per contro il contenuto in fenoli che rimane stabile durante quasi tutta la fermentazione, diminuisce

solo nella fase finale del bioprocesso. Dunque, mentre gli zuccheri ed altri componenti organici sono metabolizzati da *C. cylindracea*, sembra che i fenoli non siano utilizzati dal lievito.

Infine, dai dati in Tabella 4.18, emerge che il pH non ha nessuno effetto sui valori percentuali di abbattimento degli zuccheri totali e del COD nel refluo finale per tutti i casi sotto studio, mentre incide in maniera significativa sulla riduzione dei fenoli totali; in particolare il risultato migliore si ha quando il pH è mantenuto costante a 6,5.

Effetto della velocità di agitazione sulla produzione di lipasi da *C. cylindracea*

Per studiare l'influenza della velocità di agitazione sulla produzione di lipasi da *C. cylindracea* coltivata su un terreno a base di un refluo agro-industriale, sono stati condotti una serie di esperimenti a 300, 500 e 700 giri/min. Per quanto riguarda l'intervallo di indagine (velocità di agitazione delle giranti) da utilizzare in questi esperimenti, ci si è basati su studi precedenti condotti in fermentatore relativamente all'effetto dell'agitazione sull'inattivazione della lipasi da *C. cylindracea* (Lee & Choo, 1989). In particolare, gli autori hanno eseguito una serie di prove a diverse velocità di agitazione, 300, 450, 600 e 900 giri/min, su 1360 ml di una soluzione di lipasi allo 0,1%. La lipasi si è dimostrata piuttosto sensibile alla velocità di agitazione: al di sopra di 450 giri/min è stata osservata una significativa perdita di attività che tendeva a crescere all'aumentare della durata dell'esperimento. Però, in questo stesso lavoro è stato anche osservato che aggiungendo un agente antischiuma o riempiendo il fermentatore fino all'orlo, piuttosto che lasciarlo mezzo vuoto, la denaturazione dell'enzima può diminuire del 93 e 97%, rispettivamente.

Diversi autori hanno, anche, dimostrato che la presenza di aria è essenziale per la produzione di lipasi da *C. rugosa*, in particolare una concentrazione elevata di ossigeno nel mezzo è fondamentale per la crescita cellulare e di conseguenza per la produzione dell'enzima (Tan et al., 2003; Puthli et al., 2006). E' anche per questa ragione che in molti studi relativi alla produzione di lipasi da questo lievito in bioreattore, sono state adottate condizioni colturali di agitazione tali da mantenere il valore percentuale di ossigeno disciolto nel mezzo superiore al 20-30% di saturazione (Valero et al., 1991; Gordillo et al., 1995; Montesinos et al., 1997; Dalmau et al., 1998; Sanchez et al., 1999).

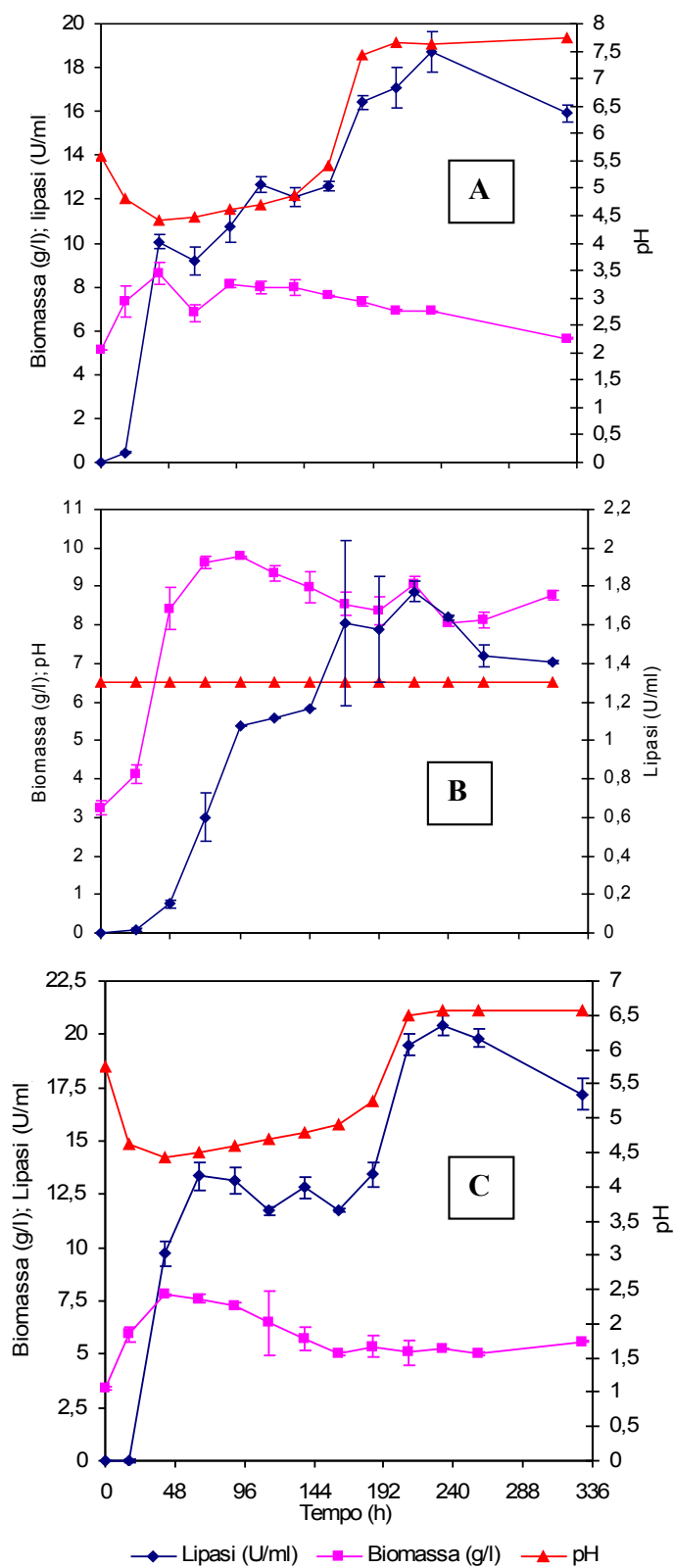


Figura 4.24 Effetto del pH, libero (A), costante a 6,5 (B) e mantenuto < di 6,5 (C), sulla produzione di lipasi e sulla biomassa di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 in STR ad una velocità di agitazione di 500 rpm.

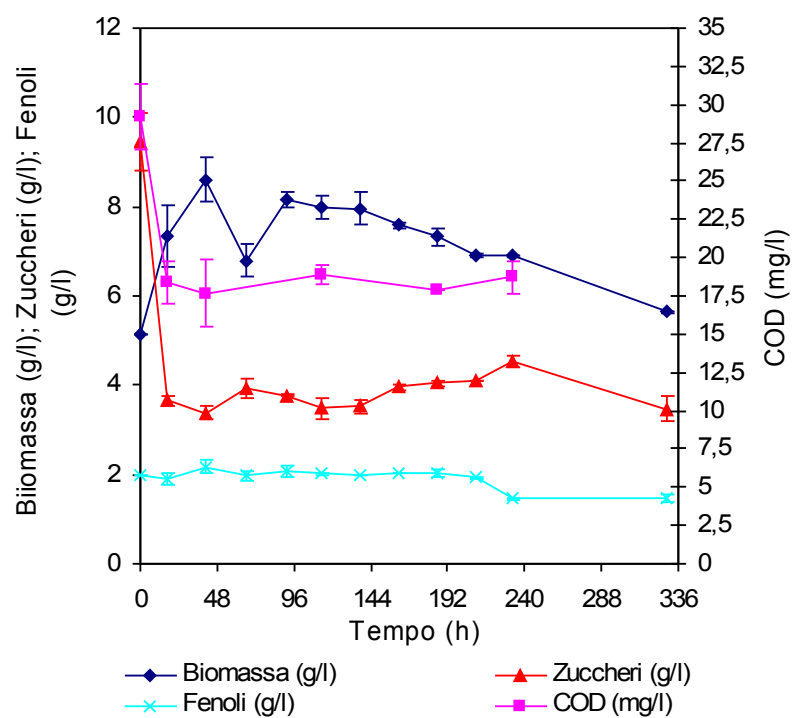


Figura 4.25 Andamento nel tempo del contenuto di zuccheri, di fenoli, del carico organico e della biomassa di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 cresciuta in STR a pH libero e ad una velocità di agitazione di 500 rpm.

Tabella 4.17 Effetto del pH sulla produzione di lipasi, sulla produttività e sulla crescita cellulare di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 coltivata su AV7 (1:2) in STR*.

Condizioni di pH	T _{max} (ore)#	Lipasi (U/ml)	Biomassa (g/l)	Produttività (U/ml h)
Libero	233	18,70±0,94 ^a	6,89±0,32 ^{ab}	0,080±0,004 ^a
Costante a 6,5	216	1,77±0,06 ^b	9,07±0,51 ^a	0,008±0,000 ^b
< 6,5	233	20,39±0,47 ^a	5,23±0,00 ^b	0,087±0,002 ^a

* I valori, riportati come media±deviazione standard di esperimenti condotti in triplo, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica. I valori seguiti dallo stesso esponente non sono significativamente differenti, secondo il Tukey test ($p < 0,05$).

Tempo di fermentazione corrispondente al momento di massima produzione enzimatica.

Tabella 4.18 Effetto del pH sull'abbattimento della componente organica da parte di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 cresciuta su AV7 (1:2) in STR*.

Condizioni di pH	Zuccheri totali (g/l)	Fenoli totali (g/l)	COD (g/l)
Libero	3,82±0,31 (59,60)#	1,69±0,10 (14,94)	18,84±1,10 (35,46)
Costante a 6,5	4,64±0,23 (52,89)	1,42±0, (37,82)	15,93±1,02 (35,76)
< 6,5	4,46±0,00 (54,31)	2,22±0,21 (0,21)	19,40±0,53 (31,56)

* I valori, riportati come media±deviazione standard, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica

In parentesi sono riportati i valori percentuali (%) di abbattimento rispetto al to.

Nel presente studio sono stati condotti, quindi, anche esperimenti in STR in cui si è cercato di assicurare un livello di ossigeno disciolto nel brodo superiore al 20% di saturazione, controllando automaticamente, attraverso un microprocessore, la velocità di agitazione tra 300 e 800 giri/min.

Confrontando i risultati ottenuti, riportati in Tabella 4.19, per le tre velocità di agitazione (300, 500 e 700 giri/min), si osserva che il processo condotto a 500 giri/min è risultato essere il più efficiente, con livelli di attività enzimatica di 18,70 U/ml dopo 233 ore di fermentazione. Un discreto livello di attività lipolitica è stata anche raggiunto con una velocità di agitazione di 700 giri/min dopo solo 120 ore di fermentazione. In questo caso, però, come si può notare dalla Figura 4.26, la biomassa cellulare, che inizialmente è cresciuta molto rapidamente raggiungendo valori paragonabili a quelli delle altre tesi in esame, ha subito una diminuzione molto più marcata e rapida di quella degli altri due casi. Contemporaneamente al calo della biomassa, è stata notata una diminuzione dell'attività enzimatica; questo fenomeno non è stato, invece, osservato nei reattori a 300 e 500 giri/min. E' stato ipotizzato che a valori così elevati di agitazione e per periodi di tempo piuttosto prolungati, le cellule di *C. cylindracea* potessero subire fenomeni di lisi. Di conseguenza sono state condotte, su vari prelievi eseguiti dai fermentatori alle varie condizioni di agitazione (300, 500, 700 giri/min e $300 < \text{giri/min} < 800$), analisi finalizzate a evidenziare l'eventuale presenza di attività malato-deidrogenasica indice di lisi cellulare (Li & Chen, 1994). I risultati, hanno confermato che effettivamente il microrganismo è andato incontro a lisi cellulare ma solo nella tesi in cui la velocità di agitazione è stata mantenuta fissa a 700 giri/min e solo dopo la 120^{esima} ora di fermentazione.

Nel caso in cui le giranti nel reattore hanno lavorato a 300 giri/min, l'attività lipolitica massima è stata molto bassa, sono state prodotte solo 2,54 U/ml.

Un'altra considerazione che può essere fatta osservando i grafici in Figura 4.26, è che mantenendo la velocità di agitazione a valori di 300, 500 e 700 giri/min, il valore percentuale dell'ossigeno disciolto nel terreno durante le prime ore della fermentazione è sceso all'0% e questo potrebbe aver influenzato in maniera negativa la vitalità delle cellule e di conseguenza la produzione dell'enzima. Per questo motivo sono stati condotti degli esperimenti in cui si è cercato di mantenere l'ossigeno disciolto a valori superiori al 20% di saturazione, controllando automaticamente la velocità di agitazione tra 300 e 800 giri/min. Il valore di 800 giri/min è stato raggiunto per periodi di tempo molto brevi e solo tra la 18^{esima} e la 30^{esima} ora di fermentazione per tutto il resto del

processo la velocità di agitazione si è mantenuta a 300 giri/min.

I risultati (Tabella 4.19 e Figura 4.26) mostrano che la produzione massima di lipasi (18,5 U/ml) ha raggiunto livelli statisticamente simili alla tesi in cui la velocità di agitazione è stata mantenuta fissa a 500 giri/min, però in quest'ultimo caso la produttività è stata inferiore.

In via preliminare sono stati misurati i valori della K_{La} , sia per l'acqua distillata che per le AV, e i risultati sono riportati in Tabella 4.21. Come si può osservare, non sono state registrate differenze tra i valori ottenuti per l'acqua distillata e quelli ottenuti per le acque di vegetazione. In STR, il valore massimo della K_{La} è stato raggiunto a 500 giri/min, aumentando ulteriormente la velocità di agitazione non è stato notato un incremento statisticamente significativo di questo parametro.

In Figura 4.27 sono riportati gli andamenti della velocità di trasferimento dell'ossigeno (Q_{O_2X} , che può anche essere espresso come OTR) all'interno dei fermentatori alle varie velocità di agitazione prese in esame in questa fase di studio. Dall'andamento di Q_{O_2X} e di Q_{CO_2X} si può osservare che, nelle prime 40 ore della fermentazione corrispondenti al momento di massima crescita cellulare, la respirazione cellulare è stata molto elevata, di conseguenza si è stabilito un notevole scambio di ossigeno. Aumentando la velocità di agitazione, il trasferimento dell'ossigeno è stato più efficiente; infatti, il picco massimo per i valori di Q_{O_2X} è stato superiore a velocità di agitazione più elevate (8,19, 8,92, 16,53 e 9,49 mmol/m³ s a 300, 500, 700 giri/min e 300<giri/min<800, rispettivamente). Una maggiore efficienza nel trasferimento di ossigeno si è tradotta in un miglioramento nella produttività del bioprocesso (Tabella 4.19 e Figura 4.26). Lo stesso risultato è stato osservato anche da altri autori (Chen et al., 1998; Elibol & Ozer, 2000). Nella fase fermentativa successiva, eccetto per la tesi a 300 giri/min, sono stati registrati altri picchi di Q_{O_2X} (Figura 4.27) e, contemporaneamente, anche una lieve diminuzione nei valori di ossigeno disciolto (Figura 4.26), che non erano dovuti alla crescita cellulare poiché non sono stati accompagnati da un aumento dei valori di Q_{CO_2X} . Una possibile spiegazione si potrebbe trovare nell'instaurarsi di processi di ossidazione dei fenoli presenti nel terreno. Una prova a supporto di questa ipotesi è stata la variazione di colore subita dal brodo, dal marrone chiaro al marrone scuro, in questa fase della fermentazione.

Si può osservare dalla Figura 4.26 che, eccetto per la tesi a 300 giri/min, la produzione di lipasi è aumentata rapidamente nelle prime ore della fermentazione, raggiungendo livelli di circa 10-13 U/ml, e dopo una breve fase stazionaria, ha subito un nuovo

incremento di circa il 30%. Inoltre, la produttività del primo picco di attività è stata nettamente superiore rispetto a quella del secondo picco ed è stata maggiore nel caso in cui si è riusciti a mantenere l'ossigeno disciolto a valori superiori al 20% di saturazione ($0,293 \pm 0,017$ U/ml h) rispetto alle tesi a 500 e 700 giri/min ($0,245 \pm 0,008$ e $0,152 \pm 0,011$ U/ml h, rispettivamente) (Figura 4.26). La comparsa di due picchi di attività è stata, anche, osservata nelle prove in bioreattore condotte per valutare l'effetto del pH, ma non durante gli studi fatti in beuta, dove in particolare la produzione di enzima è aumentata gradualmente fino a valori massimi di circa 10 U/ml. Dunque, il trasferimento di scala dalla beuta al bioreattore ha permesso di migliorare notevolmente la produzione e, inoltre, si potrebbe ipotizzare che le diverse condizioni di agitazione e di aerazione che sono state ottenute nel reattore STR rispetto alle beute hanno favorito la produzione di più isoenzimi con diverse attività lipolitiche la cui tempistica di produzione e di secrezione nel brodo potrebbe essere regolata da diverse condizioni culturali. In questo contesto e in vista di una eventuale attuazione a livello industriale di questo processo, potrebbe essere vantaggioso interrompere la fermentazione dopo la comparsa del primo picco di attività se l'isoenzima secreto fosse di interesse applicativo. Studi in tal senso dovrebbero essere condotti nelle ulteriori fasi di scale-up del processo.

Per quanto riguarda l'abbattimento del carico organico del refluo finale, dalla Tabella 4.20, si deduce che condizioni di maggiore agitazione/aerazione, 700 giri/min e $300 < \text{giri/min} < 800$, hanno favorito la riduzione del contenuto zuccherino (70,47 e 62,30%, rispettivamente) rispetto alle tesi a 300 e 500 giri/min (59,49 e 59,69%, rispettivamente). L'abbattimento maggiore del COD è stato osservato per la tesi a 700 giri/min, quindi, sempre in condizioni di agitazione/aerazione piuttosto spinte. Per contro, la maggiore riduzione del contenuto di fenoli totali si è avuta nei reattori a 300 e 500 giri/min (9,89 e 14,94%, rispettivamente).

4.8.9 Caratterizzazione del profilo isoenzimatico sul campione grezzo da *C. cylindracea* cresciuto sul terreno a base di AV ottimizzato in STR

C. rugosa produce più isoenzimi con attività lipolitica che possono essere codificati a partire da 7-10 geni chiamati Lip1, Lip2, Lip3 fino a Lip7; fra questi, cinque (Lip1 – Lip5) sono stati biochimicamente caratterizzati (Lotti et al., 1994 a,b; Brocca et al., 1995; Lotti & Alberghina, 1996). Tutti i campioni di lipasi commerciale, ottenute da *C.*

Tabella 4.19 Effetto dell'agitazione sulla produzione di lipasi, sulla produttività e sulle crescita cellulare di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 coltivata su AV7 (1:2) in STR*.

Condizioni di agitazione	T _{max} (ore)#	Lipasi (U/ml)	Biomassa (g/l)	Produttività (U/ml h)
300 giri/min	91	2,54±0,22 ^b	8,37±0,21 ^a	0,028±0,001 ^b
500 giri/min	233	18,70±0,94 ^a	6,89±0,32 ^{ab}	0,080±0,004 ^c
700 giri/min	120	11,65±0,72 ^c	7,42±0,18 ^a	0,097±0,006 ^a
300<giri/min<800 DO > 20%	185	18,5±1,10 ^a	4,84±0,55 ^b	0,100±0,006 ^a

* I valori, riportati come media±deviazione standard di esperimenti condotti in triplo, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica. I valori seguiti dallo stesso esponente non sono significativamente differenti, secondo il Tukey test ($p < 0,05$).

Tempo di fermentazione corrispondente al momento di massima produzione enzimatica.

Tabella 4.20 Effetto dell'agitazione sull'abbattimento della componente organica da parte di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 cresciuta su AV7 (1:2) in STR*.

Condizioni di agitazione	Zuccheri totali (g/l)	Fenoli totali (g/l)	COD (g/l)
300 giri/min	3,91±0,06 (59,49)#	1,85±0,12 (9,89)	18,06±0,32 (40,77)
500 giri/min	3,82±0,31 (59,60)	1,69±0,10 (14,94)	18,84±1,10 (35,46)
700 giri/min	2,80±0,08 (70,47)	3,09±0,30 (7,06)	15,12±0,00 (48,28)
300<giri/min<1000 DO > 20%	3,96±0,18 (62,30)	2,27±0,09 (1,54)	19,38±0,55 (32,20)

* I valori, riportati come media±deviazione standard, si riferiscono al momento di massima produzione enzimatica

In parentesi sono riportati i valori percentuali (%) di abbattimento rispetto al to.

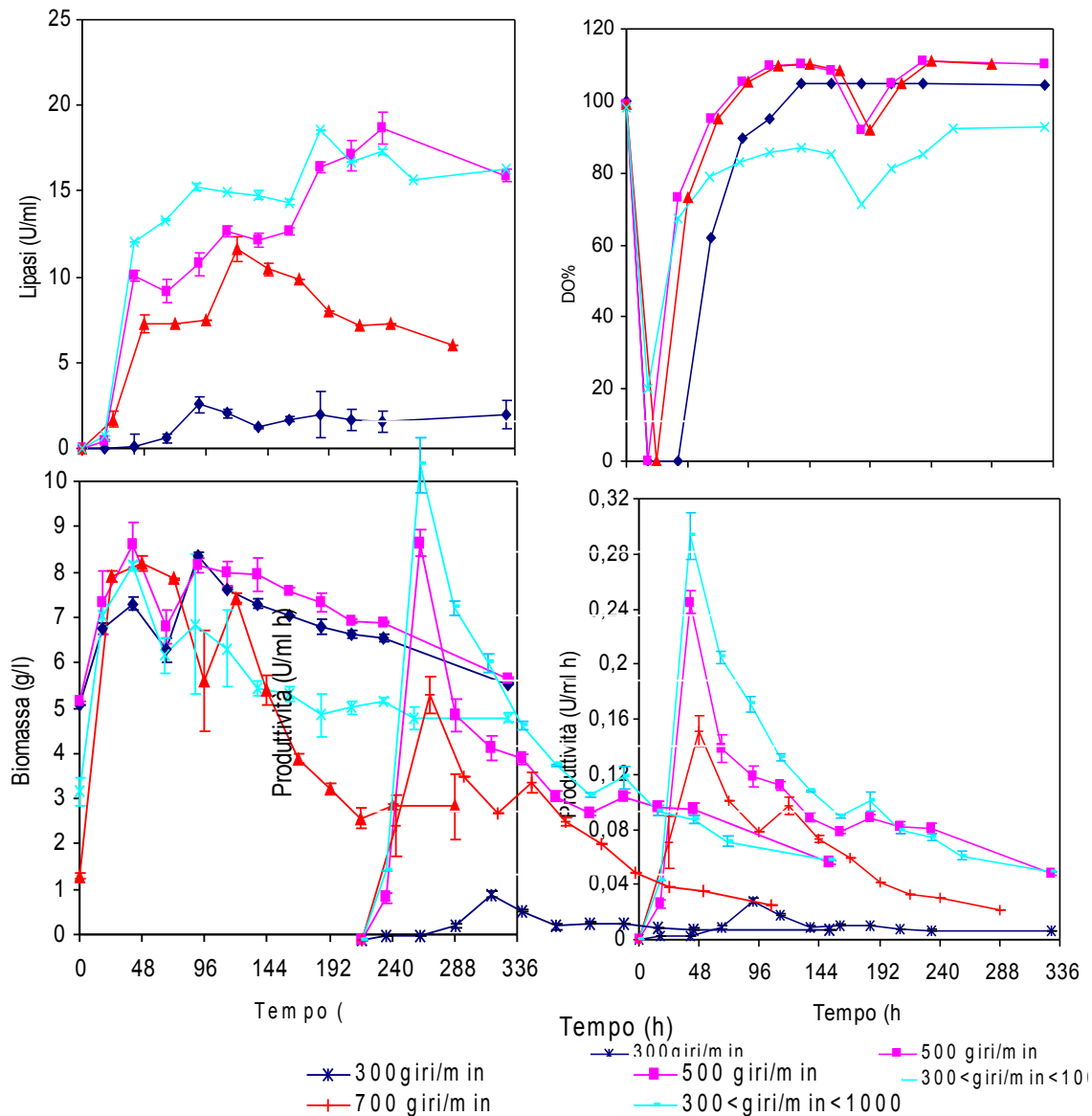


Figura 4.26 Andamento nel tempo della produzione di lipasi, della produttività, dell'ossigeno disciolto e della biomassa di *C. cylindracea* NRRL Y-17506 coltivata su AV7 (1:2) in STR a diverse condizioni di agitazione: 300, 500 e 700 giri/min; 300 < giri/min < 800, controllati automaticamente per assicurare un DO > 20%.

Tabella 4.21 Valori di K_La nei bioreattori STR e Airlift misurati in acqua deionizzata e nelle AV ad un flusso di aria di 1 v/v per minuto.

Condizioni	K_La in acqua deionizzata (s^{-1})	K_La in AV (s^{-1})
STR 300 (giri/min)	$0,0645 \pm 0,001^b$	$0,0647 \pm 0,004^b$
STR 500 (giri/min)	$0,1317 \pm 0,002^a$	$0,1314 \pm 0,003^a$
STR 700 (giri/min)	$0,1476 \pm 0,0005^a$	$0,1461 \pm 0,005^a$
Airlift 1 (v/v per minuto)	$0,1253 \pm 0,001$	$0,1250 \pm 0,002$

Le medie in colonna seguite dallo stesso esponente non sono significativamente diverse ($P < 0,05$) secondo il Tukey test.

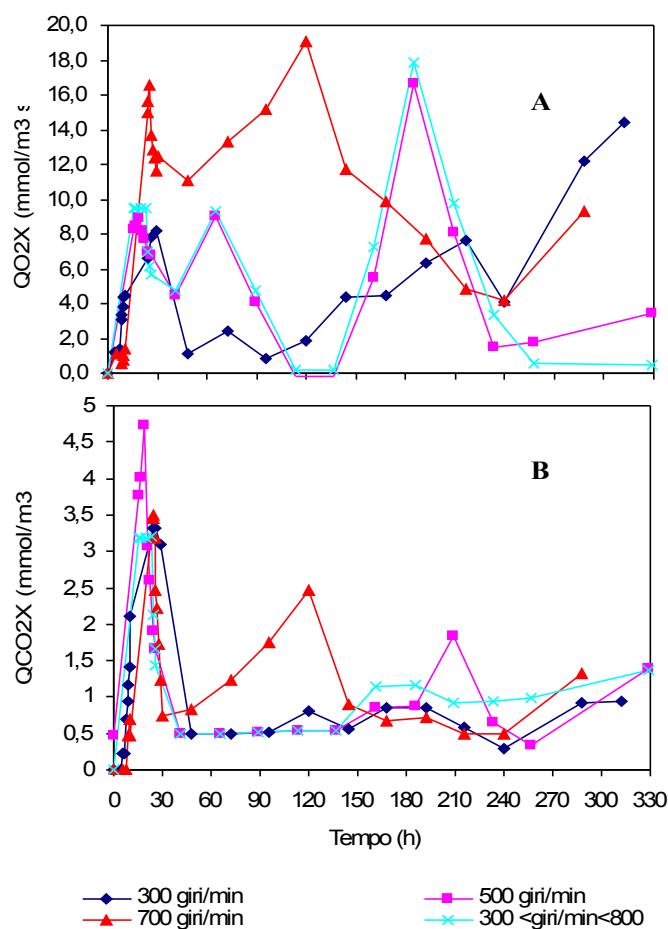


Figura 4.27 Andamento nel tempo, in STR, delle velocità di trasferimento dell'ossigeno (A) e di anidride carbonica (B) (Q_{O_2X} o OTR e Q_{CO_2X}) nelle varie condizioni di agitazione (300, 500, 700 giri/min e $300 < \text{giri/min} < 800$) e ad un flusso di aerazione di 1 v/v per minuto durante i processi fermentativi per la produzione di lipasi da *C. cylindracea* NRRL Y-17506 cresciuta sul terreno a base di AV7 (1:2) ottimizzato.

rugosa (CRL), sono composti da una miscela di diversi isoenzimi in differenti proporzioni, e così Lip1, Lip2 e Lip3 sono stati trovati in alcuni preparati commerciali grezzi in percentuali variabili, e tali isoenzimi mostrano proprietà catalitiche e specificità di substrato diverse (Ruà et al., 1993; Linko & Wu, 1996; Diezfalusy et al., 1997; Ferrer et al., 2001; Pernas et al., 2001; Lopez et al., 2004). Questa eterogeneità può essere il risultato dell'espressione di geni diversi e/o modificazioni post-translazionali modulati dalle condizioni colturali (Lotti & Alberghina, 1996; Dalmau et al., 2000; Dominguez de Maria, 2002) e da differenti strategie di coltivazione (batch, fed-batch) (Gordillo et al., 1998; Dominguez de Maria et al., 2005).

In questa ultima fase della tesi di dottorato, è sembrato interessante condurre uno studio preliminare sul profilo isoenzimatico degli enzimi lipolitici prodotti da *C. cylindracea* NRRL Y-17506 coltivata sul terreno a base di AV e nelle condizioni colturali (pH, agitazione/aerazione) fin qui ottimizzate.

In prima battuta, sono stati condotti una serie di esperimenti di elettroforesi su gel di poliacrilammide per determinare il numero e il peso molecolare delle bande con attività lipolitica presenti nel campione di lipasi commerciale (Tipo VII, Sigma) e in due campioni grezzi ottenuti da *C. cylindracea* NRRL Y-17506, coltivata sul terreno a base di AV, prelevati a due tempi fermentativi diversi e corrispondenti ai due picchi di attività lipolitica raggiunti durante le prove in STR (I° e II° picco, 48^{esima} e 192^{esima} ora, rispettivamente). I gel sono stati colorati per attività con una soluzione di staining contenente come substrato specifico per le lipasi, β -naftilbutirrato.

In Figura 4.28 è stata riportata la foto del gel di poliacrilammide (15%) ottenuto in condizioni parzialmente denaturanti e non-riducenti e incubato overnight con la soluzione di staining. Dalla foto del gel si può notare la presenza, in tutti e tre i campioni in esame, di una banda a peso molecolare (PM) superiore a 208 kDa. Di conseguenza, sono successivamente stati eseguiti una serie di esperimenti di elettroforesi su gel di poliacrilammide a porosità decrescenti (13, 12, 10 e 7,5%) per ottimizzare la separazione delle bande; tuttavia, in tutte le prove effettuate è sempre stata ottenuta questa banda alta, trattenuta all'inizio del gel separatore. E' stato allora ipotizzato che non si trattasse di una vera e propria banda ma di un artefatto la cui presenza fosse la conseguenza della formazione di aggregati enzimatici accumulati e trattenuti all'interfaccia tra il gel spaziatore e il gel sparatore che non sono riusciti a correre e quindi ad essere separati lungo il gel. Questo fenomeno di aggregazione non è inusuale per le lipasi ed è riportato da vari autori sia per *C. rugosa* che per altri

microrganismi, come ad esempio per *Bacillus thermocatenulatus* e *B. thermoleovorans* (Shaw & Chang, 1989; Luisa Ruà et al., 1997; Sanchez et al., 1999; Pernas et al., 2000; Castro-Ochoa et al., 2005).

Oltre alla banda di attività a PM superiore a 208 kDa, sia per il campione commerciale che per i campioni ottenuti dal ceppo di *C. cylindracea* utilizzato in questo studio, è stata evidenziata un'altra banda corrispondente ad un PM di 36,7 kDa; invece, solo per il campione grezzo prelevato alla 192^{esima} ora è stata individuata una banda a cui è stato attribuito un PM di 84,1 kDa.

Per superare i problemi dovuti alla formazione di aggregati durante le prove di elettroforesi su gel di poliacrilammide e riuscire a caratterizzare il profilo isoenzimatico ed assegnare i valori di punto isoelettrico (pI) alle isoforme presenti nella miscela grezza ottenuta dalle fermentazioni, sono stati condotti alcuni esperimenti di isoelettrofocalizzazione analitica (IEF) e i risultati ottenuti sono mostrati in Figura 4.29. Nel gel sono stati caricati gli stessi campioni utilizzati per l'elettroforesi su gel di poliacrilammide. La linea 1 del gel, che rappresenta il profilo isoenzimatico del campione commerciale, mostra tre bande attive alla colorazione specifica per l'attività lipolitica (β -naftilbutirrato): una banda maggiore a pI di 4,7 e due minori ai pIs 5,5 e 5,7. La banda intensa a pI 4,7 è presente anche nei campioni grezzi da *C. cylindracea* prelevati durante le prove in fermentatore (Linea 2 e 3, Figura 4.29). Per quanto riguarda il campione prelevato alla 48^{esima} ora, sono state osservate anche una banda piuttosto intensa a pI 5,1 e una tripletta di bande più deboli a pIs di 5,06, 5,0 e 4,9. Durante la fermentazione il profilo isoenzimatico del campione ha subito delle modifiche: infatti, alla 192^{esima} ora, le bande a pIs 5,1, 5,0 e 4,9 sono scomparse, mentre è comparsa una banda di attività intensa a cui è stato assegnato un pI di 4,5. Infine, in entrambi i campioni grezzi è stata rilevata una banda tenue a pI 3,8.

I risultati ottenuti non sono lontani da quelli riportati da altri autori per le lipasi da *C. rugosa*. Ruà et al. (1993) riportano valori di pIs per le isoforme Lip1 e Lip3 purificate da preparati commerciali (Sigma) di 4,8, 4,85, 4,95 e 5,04 per la prima e 5,5 per l'ultima. I valori calcolati, invece, da Lotti & Alberghina (1996) per Lip2 e Lip3 sono 4,9 e 5,1, rispettivamente. Pernas et al. (2000), hanno assegnato all'isoforma Lip2 pIs pari a 4,8 e 5, mentre all'isoforma Lip3 pIs di 5,8 e 5,5. Lopez et al. (2000) hanno purificato e caratterizzato due isoforme di lipasi B (miscela di 4 isoforme denominata anche Lip1) che costituisce il 70% del preparato commerciale da *C. rugosa* (tipo VII, Sigma) a cui hanno attribuito pIs di 4,8 e 4,7.

I pIs di 3,79 e 4,50 rappresentano valori un po' anomali rispetto ai pIs riportati per le lipasi da *C. rugosa*. Comunque, punti isoelettrici simili sono stati trovati per enzimi lipolitici ottenuti da altri microrganismi, per esempio da alcuni ceppi di *Aspergillus niger* (pI 4,1, 4,2 e 3,5-4,5) e da *Ophiostoma piliferum* (pI 3,6 e 3,79) (Pokorny et al., 1997; Brush et al., 1999). L'eterogeneità degli isoenzimi della lipasi rilevati dopo IEF potrebbe essere dovuta alla microeterogeneità nella glicosilazione delle proteine come è stato osservato per le lipasi da *G. candidum* e *P. camembertii* (Hedrich et al., 1993) e anche suggerito per Lip1 da *C. rugosa* (Grochulski et al., 1993). Alcuni autori hanno suggerito che la quantità percentuale di carboidrati che si legano in maniera covalente alle proteine potrebbe essere, anche, influenzata dalle condizioni colturali (Grochulski et al., 1993; Chang et al., 1994).

Durante le prove di ottimizzazione della produzione di lipasi da *C. cylindracea* sul terreno a base di AV condotte in bioreattore è stata sottolineata la comparsa di un primo picco di attività durante le prime 40 ore, seguito da una fase stazionaria nella produzione di lipasi, e poi il raggiungimento di un secondo picco massimo molto più elevato intorno alle 200 ore. Era stato ipotizzato che questo andamento potesse essere dovuto alla produzione di due isoforme con attività lipolitica diversa. I risultati ottenuti sia con gli esperimenti di elettroforesi su gel di poliacrilammide che con quelli di IEF sono in accordo con questa teoria, infatti, mettono in evidenza la presenza di una banda di attività piuttosto intensa nel campione prelevato alla 192^{esima} ora che non è presente in quello prelevato alla 48^{esima}.

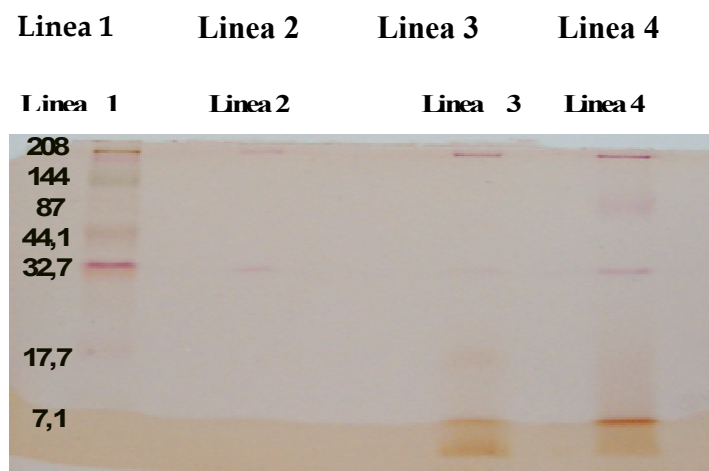


Figura 4.28 Elettroforesi su gel di poliacrilammide (15%) eseguita in condizioni parzialmente denaturanti e non-riducenti. Il gel è stato colorato per attività overnight: linea 1, standards di peso molecolare; linea 2, CRL (Tipo VII, Sigma); linee 3 e 4, campione grezzo da *C. cylindracea* NRRL Y-17506, coltivata sul terreno a base di AV ottimizzato, prelevato alla 48^{esima} (3) e 192^{esima} (4) ora di fermentazione, rispettivamente.

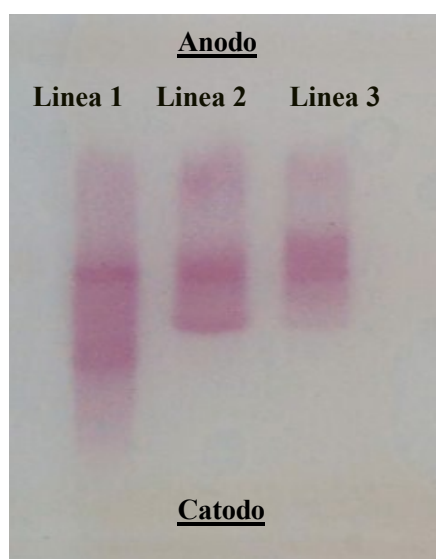


Figura 4.29 Gel di isoelettrofocalizzazione (intervallo anfoline 2,8-6,6) colorato per attività: linea 1, CRL (Tipo VII, Sigma); linee 2 e 3, campione grezzo da *C. cylindracea* NRRL Y-17506, coltivata sul terreno a base di AV ottimizzato, prelevato alla 48^{esima} (2) e 192^{esima} (3) ora di fermentazione, rispettivamente.

5. CONCLUSIONI

Lo smaltimento delle acque reflue dei frantoi oleari costituisce un problema tuttora in cerca di una soluzione tecnico-economica definitiva. Per questo motivo, negli ultimi anni, si è cercato di valorizzare questo refluo, con l'obiettivo di ottenere prodotti a medio o elevato valore aggiunto attraverso processi chimico-fisici o fermentativi.

Lo scopo iniziale del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare la possibilità di valorizzare le AV utilizzando questo refluo come substrato per microrganismi in grado di crescervi e produrre enzimi lipolitici di potenziale interesse applicativo, riducendo allo stesso tempo il suo carico inquinante.

La sperimentazione riferita alla prima fase di screening ci ha permesso di trarre le seguenti conclusioni:

- tutti i 12 ceppi scelti per il lavoro di screening sono risultati in grado di crescere sul refluo, ridurre il carico inquinante e produrre attività lipasica;
- tra i ceppi selezionati in una prima fase dello studio (*Penicillium citrinum* NRRL 1841, NRRL 3754, ISIRIM 118, *Candida cylindracea* NRRL Y-17506, e *Geotrichum candidum* NRRL Y-553), solo *C. cylindracea* ha variato la produzione enzimatica in modo significativo, raggiungendo i livelli più elevati di attività, al variare del tipo di AV;
- le fonti azotate di tipo ammoniacale, in particolare NH_4Cl , hanno favorito la produzione enzimatica, soprattutto nel caso di *C. cylindracea*;
- solo *C. cylindracea* NRRL Y-17506 è stata influenzata in misura rilevante dall'aggiunta di oli; tra gli oli in esame, l'olio di oliva è risultato il più efficace permettendo di ottenere una produzione enzimatica di 9,23 U/ml; per contro, la produzione di enzimi lipolitici da *P. citrinum* NRRL 1841 e *G. candidum* NRRL Y-553 potrebbe essere solo costitutiva;
- *Penicillium citrinum* NRRL 1841 ha mostrato un' interessante attività defenolante indipendentemente dalla fonte azotata o dall'aggiunta di oli.

Questa prima fase di studio ha dimostrato la fattibilità tecnica di un processo fermentativo finalizzato alla valorizzazione dei reflui oleari mediante la produzione di enzimi ad attività lipolitica. Inoltre, il refluo dopo il processo fermentativo ha un carico inquinante ridotto e quindi risulta più gestibile nel contesto di processi tradizionali di smaltimento.

In base ai risultati ottenuti, tra tutti i ceppi esaminati sono stati selezionati ed ulteriormente studiati il fungo *P. citrinum* NRRL 1841 e il lievito *C. cylindracea* NRRL Y-17506.

P. citrinum è stato scelto perché oltre ad aver dimostrato di riuscire a crescere indistintamente su tutte le tipologie di AV e a produrvi enzimi lipolitici, è il microrganismo che ha permesso di ottenere il maggiore abbattimento del contenuto di fenoli totali sul refluo finale. *C. cylindracea* (denominata anche *C. rugosa*), ben noto produttore di lipasi anche a livello industriale, invece, è stata scelta perché ha permesso di raggiungere livelli di produzione in assoluto più elevati e molto promettenti, rispetto alle altre specie microbiche in studio. Inoltre, un altro aspetto che ci ha guidato nella selezione di questi due microrganismi ad attività lipolitica, è stato il loro diverso comportamento nei confronti dell'aggiunta di oli.

A questo punto, lo scopo ultimo di questa tesi di dottorato è stato quello di ottimizzare la composizione del terreno e le condizioni colturali per la produzione di lipasi da *P. citrinum* e *C. cylindracea* coltivati su un substrato a basso costo costituito da acque di vegetazione. Lo studio sulla composizione colturale ottimale è stata effettuata in beuta utilizzando un approccio multi-fattoriale per *P. citrinum* e un approccio tradizionale per *C. cylindracea*.

Infine, per valutare la fattibilità tecnica di un trasferimento di scala del bioprocesso e approfondire la messa a punto del processo fermentativo sono stati condotti, per entrambi i microrganismi, una serie di esperimenti in bioreattore da banco.

Per quanto riguarda l'ottimizzazione della produzione di lipasi da *P. citrinum* NRRL 1841, gli esperimenti condotti in beuta e in reattori da banco a differente configurazione (STR e Air-lift) hanno portato ai seguenti risultati:

- la composizione del terreno di produzione a base di acque di vegetazione ottimizzato tramite l'approccio fattoriale è risultata essere la seguente: pH 6,15, NH₄Cl 2,7 g/l ed Estratto di Lievito 1,1g/l; in queste condizioni colturali la produzione enzimatica ha raggiunto 1,242 U/ml
- in STR il bioprocesso è risultato più efficiente rispetto all'Airlift sia in termini di produzione di lipasi che di abbattimento del carico inquinante del refluo finale e in particolare del contenuto di fenoli; inoltre, bisogna anche sottolineare che nel reattore di tipo Air-lift si è generata molta schiuma e, conseguentemente, è stato necessario aggiungere antischiuma con una discreta frequenza;
- la produzione massima di lipasi raggiunta lavorando con le due tipologie di

reattori sono state significativamente più basse di quelle raggiunte in beuta. Infine, lo studio sull'ottimizzazione del bioprocesso per la produzione di lipasi da *C. cylindracea* NRRL Y 17506 coltivata su un terreno a base di AV, sia in beuta che in reattore STR, ha portato a trarre le seguenti conclusioni:

- il lievito in esame è risultato in grado di crescere su tutte le tipologie di AV utilizzate nel presente lavoro; comunque, tra le AV selezionate, le migliori in termini di produzione enzimatica sono risultate essere quelle con un basso contenuto in zuccheri totali;
- l'aggiunta di olio di oliva ha avuto un effetto positivo sia sulla crescita cellulare che sulla produzione di lipasi; tra le varie concentrazioni utilizzate, quella di 3 g/l è risultata la migliore;
- la presenza di Tween 80 ha interferito con la crescita microbica e, di conseguenza, con la produzione di lipasi;
- l'aggiunta di glucosio ha avuto un effetto inibente sull'attività enzimatica;
- l'aggiunta di vari fattori di crescita non ha influito sulla produzione di lipasi ad eccezione dell'estratto di malto con il quale sono stati osservati livelli di attività più bassi;
- le prove di ottimizzazione condotte in STR hanno dimostrato che una buona ossigenazione del terreno è importante per la vitalità delle cellule del lievito e, di conseguenza, per aumentare la produttività del processo fermentativo;
- nelle fermentazioni condotte a 300 giri/min, è stata ottenuta una produzione enzimatica molto bassa (2,54 U/ml); mentre, a 700 giri/min *C. cylindracea* ha subito lisi cellulare;
- la massima produzione di lipasi è stata ottenuta in bioreattore lavorando ad una velocità di agitazione costante di 500 giri/min (18,50 U/ml) o ad una velocità di agitazione variabile tra 300 e 800 giri/min in modo da assicurare un valore di ossigeno disciolto nel brodo superiore al 20% di saturazione (18,70 U/ml); in quest'ultimo caso, inoltre, la comparsa del picco massimo è stata anticipata nel tempo favorendo così la produttività oraria del bioprocesso;
- il passaggio di scala del bioprocesso dalle beute al bioreattore da banco è, quindi, risultato tecnicamente possibile e produttivamente vantaggioso; la produzione massima di lipasi raggiunta, con il terreno ottimizzato e con le condizioni colturali (quali pH e agitazione/aerazione) ottimali, in STR è stata, di

fatto, quasi raddoppiatala (da 9,48 a 18,70 U/ml);

- dagli esperimenti di isoelettrofocalizzazione (IEF) analitica è stato osservato che il campione grezzo ottenuto coltivando *C. cylindracea* sul terreno a base di AV ottimizzato è costituito da più isoenzimi con attività lipolitica e che il profilo isoenzimatico ha una sola banda in comune con quello della lipasi commerciale (Typo VII, Sigma) a cui è stato assegnato pI 4,7;
- il campione grezzo che è stato prelevato alla 48^{esima} ora di fermentazione (I° picco di massima attività) ha un profilo isoenzimatico diverso rispetto a quello del campione prelevato alla 192^{esima} ora (II° picco di massima attività): in particolare, in quest'ultimo caso, è stata notata la presenza di una banda intensa in più a pI 4,5.

In conclusione, le acque di vegetazione rappresentano un buon substrato da utilizzare in processi fermentativi per la produzione di enzimi, in particolare ad attività lipolitica. Molti microrganismi sono in grado di crescervi e produrre lipasi, però per i buoni livelli di attività enzimatica raggiunti, il lievito *C. cylindracea* NRRL Y-17506 è quello più interessante. Un bioprocesso finalizzato alla valorizzazione dei reflui oleari attraverso la produzione di enzimi lipolitici utilizzando questo lievito è tecnicamente possibile e produttivamente promettente. Ovviamente ulteriori fasi di scale up del processo sono ancora necessarie al fine di poter effettuare una valutazione sulla fattibilità economica del processo. Va, inoltre, sottolineato che proposte di valorizzazione microbica delle AV, quale quella indagata nella presente tesi di dottorato, non devono essere viste come una possibile soluzione allo smaltimento massivo di questo refluo ma come uno dei possibili approcci che permetta di valorizzare limitate quantità del refluo. Sarà poi l'impiego diversificato di varie tecnologie di valorizzazione affiancate anche a tecnologie applicabili su quantità notevoli di refluo (es. digestione anaerobica e compostaggio) a dare un significativo contributo alla soluzione del problema dello smaltimento delle acque reflue dei frantoi oleari.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abbas H, Hiol A, Deyris V, Comeau L, (2002).** Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 968-975.
- Abdel-Mohsen SI, (1996).** Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. *Process Biochemistry*, 31: 645-650.
- Aisaka K, Terada O, (1979).** Production lipoprotein lipase and lipase by *Rhizopus japonicus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43: 2125.
- Akoh CC, Lee GC, Shaw JF, (2004).** Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. *Lipids*, 39: 513-526.
- Alba Mendoza J, (1992).** Ambiente, Tecnologia e Produzione olivicola nell'area mediterranea. Convegno, Impruneta.
- Alianiello F, (1999).** Acque di vegetazione da frantoio, un problema ancora aperto. *L'informatore Agrario*, 15: 33-35.
- Amat di San Filippo P, Rinaldi A, Sanjiust di Teulada E, Satta G, Viola A, (1986).** Rivista Merceologica, 25: 183-199.
- Andrich G, Balzini S, Zinnai A, Silvestri S, Fiorentini R, (1992).** Effect of olive oil waste water irrigation on olive plant. *Agriculture and Medicine*, 122: 97-100.
- Annenkov GA, Klepikov NN, Martynova LP, Puzanov VA, (2004).** Wide range of the use of natural lipases and esterases to inhibit *Mycobacterium tuberculosis*. *Probl Tuberk Bolezn Legk*, 52-56.
- Amirante P, (1993).** Soluzioni tecniche ed operative per l'utilizzo alternativo delle acque reflue e delle sanse in funzione delle tecnologie di estrazione olearia. Seminario di studi: Impiego alternativo della sansa e delle acque reflue dei frantoi. Roma, 29 settembre 1993, 1-35.
- Amirante P, Di Giovacchino L, Di Renzo GC, (1992).** Olive Oil Quality. Atti del Congresso Internazionale, Firenze, 115-126.
- Amirante P, Galoppini C, Jacobini N, Montedoro GF, Petruccioli G, (1989).** Relazione presentata all'Assemblea del Consiglio Superiore dell'Agricoltura del 13.4.89.
- Amirante P, Montel GL, Clovedeo ML, (2001).** Seminario su 'Utilizzazione e smaltimento dei sottoprodotti dell'estrazione olearia e relative problematiche', Spoleto, 16 Maggio 2001.

- Arbige MV, Pitcher WM, (1989).** Industrial enzymology: a look towards the future. *Tibtech*, 7: 331.
- Aunstrup K, (1979).** Production, isolation and economics of extracellular enzymes. *Applied Biochemistry and Bioengineerings*, 2: 27-69.
- Azab MS, (2000).** Re-use of wastewater of food industries for the production of fungal biomass and enzymes for the bio-treatment of wastewater. *Egyptian Journal of Biotechnology*, 7: 163–179.
- Badino jr AC, Facciotti MCR, Schmidell W, (2001).** Volumetric oxygen transfer coefficients (KLa) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. *Biochemical Engineering Journal*, 8: 111-119.
- Bailey JE, Ollis DF (1986).** Applied enzyme catalysis. In: *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed New York, NY: McGraw-Hill, 157-227.
- Baillargeon MW, Bistline RG, Sonnet PE, (1989).** Evaluation of strain of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30: 92-96.
- Ballero M, Mascia E, Rescigno A, Sanjust Di Teulada E, (1990).** Impiego di *Pleurotus* per trasformare i polifenoli delle acque reflue di frantoi oleari in proteine. *Micologia Italiana*, 3: 39-41.
- Bambalov GS, Israilidis CJ, Tanchev S, (1989a).** Characterization of yeast isolated from spontaneously fermentino fresh olivi effluents. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5: 259-61.
- Bambalov GS, Israilidis CJ, Tanchev S, (1989b).** Alchol fermentation in olive oil extraction effluents. *Biological Wastes*, 27: 71-75.
- Belaid C, kallel M, Khadhraou M, Lalleve G, Elleuch B, Fauvarque JF, (2006).** Elettrochemical treatment of olive oil mill wastewaters: removal of phenolic compounds and decolourization. *Journal of Applied Electrochemistry*, 36: 1175-1182.
- Benjamin S, Pandey A, (1996). Optimization of liquid media for lipase production by Candida rugosa. Bioresource Technology, 55: 167-170.*
- Benzonana G, Esposito S, (1971).** On the positional and chain specificities of *Candida Cylindracea* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 231: 15-22.

- Bing U, Cini E, Cioni A, Laurendi V, (1994).** Smaltimento-recupero delle sanse di oliva provenienti da un «due fasi» mediante distribuzione in campo. *L'informatore Agrario*, 47, 75-78.
- Blumenkrantz N, Absoe-Hansen G, (1973).** New method for quantitative determination of uronic acid. *Analytical Biochemistry*, 54: 484-489.
- Borgdorf R, Warwell S, (1999).** Substrate selectivity of various lipases in the esterification of *cis*- and *trans*-9-octadecenoic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 480-485.
- Borgdorf R, Warwell S, (2000).** Substrate selectivity of lipases in the esterification of *cis/trans*-isomers and positional isomers of conjugated linoleic acid (CLA). *Biotechnology Letters*, 22: 1151-1155.
- Borja R, Rincon B, Raposo F, (2006).** Anaerobic biodegradation of two-phase olive mill solid wastes and liquid effluents: kinetic studies and process performance. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81:1450–1462.
- Bradford MM, (1976).** A rapid and sensitive method for detecting microgram amounts of protein utilizing the principles of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Boucid O, Navarro D, Roche M, Asther M, Haon M, Delattre M, Lorquin J, Labat M Ashter M, Lesage-Meessen L, (2005).** Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product. *Process Biochemistry*, 40: 1855-1862.
- Briante R, Patumi M, Febbraio F, Nucci R, (2004).** Production of highly purified hydroxytytosol from *Olea Europea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic β -glycosidase. *Journal of Biotechnology*, 111: 67-77.
- Brocca S, Grandori R, Breviario D, Lotti M, (1995).** Localization of lipase genes on *Candida rugosa* chromosomes. *Current Genetic*, 28: 454-457.
- Brockeroff H, (1968).** *Biochimica et Biophysica Acta*, 159: 296.
- Brockeroff H, (1969).** *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 134: 366.
- Brockeroff H, (1970).** *Biochimica et Biophysica Acta*, 212: 92.
- Brush T, Chapman R, Kurzman R, Williams DP, (1999).** Purification and characterization of extracellular lipase from *Ophiostoma piliferum*. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 7: 2131-2138.
- Buciumeanu E, Grecu C, Bejan C, (1994).** La teneur en polyphenols chez le vignesteints des maladies virales. *Polyphenols actualites*, 11: 69.

- Burkert JFM, Maldonado RR, Maugeri FF, Rodrigues MI, (2005).** Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80: 61-67.
- Burkert JFM, Maugeri F, Rodrigues MI, (2004).** Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresources Technology*, 91: 77-84.
- Bushan B, Dosanjh NS, Kumar K, Hoondal GS, (1994).** Lipase production from an alkalophilic yeast sp. by solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, 16: 841-842.
- Cammarota MC, Freire DMG, (2006).** A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresources Technology*, 97: 2195-2210.
- Camurati F, Lanzani A, Arpino A, Ruffo C, Fedeli E, (1984).** Le acque di vegetazione della lavorazione delle olive: tecnologie ed economie di recupero dei sottoprodotti. *Rivista Italiana Sostanze Grasse*, 61: 283-292.
- Capasso R, Evidente A, Schivo L, Ormun G, Marcialis MA, Cristinzio G, (1995).** Antibacterial polyphenols from olive mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 393-398.
- Capasso R, Cutigliano A, Evidente A, (1997).** Abstract 9th Int. Symp. Env. Poll. and its Imp. on life in the Medit.Reg., 232.
- Caputo AC, Scacchia F, Pelagagge PM, (2003).** Disposal of by-products in olive oil industry: waste to energy solutions. *Applied Thermal Engineering*, 23: 197-214.
- Morena-Castilla C, Carrasco-Marin F, Lopez-Ramon MV, Alvarez-Merino MA, (2001).** Chemical and physical activation of olive mill waste water to produce activated carbons. *Carbon*, 39: 1415-1420.
- Cereti CF, Rossini F, Federici F, Quarantino D, Vassilev n, Fenice M, (2004).** Reuse of microbially treated olive mill wastewater as fertilizer for wheat (*Triticum durum* Desf). *Bioresources Technology*, 91: 135-140.
- Chang RC, Chou SJ, Shaw JF, (1994).** Multiple forms and functions of *Candida rugosa* lipase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 19: 93-97.
- Chang CS, Tsai SW, (1997).** A facile enzymatic process for the preparation of (S)-Naproxen ester prodrug in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 20: 635-639.
- Chen JY, Wen CM, Chen TL, (1998).** Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 62: 311-316.

- Christen P, Angeles N, Corzo G, Farres A, Revah S, (1995).** Microbial lipase production on a polymeric resin. *Biotechnology and Technology*, 9: 597-600.
- Christakopoulos P, Tzia C, Kekos D, Macris BJ, (1992).** Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38: 194-197.
- Ciferri R, Verona O, Luparini F, (1948).** Segnalazione e descrizione dei lieviti nelle acque di vegetazione delle olive. *Mycopatologia*, 4: 12-21.
- Cioni A, (1991).** Innovazione tecnologica nell'impiantistica olearia ed enologica. Giornata di studio, Jesi, 27-28 giugno.
- Cliffe KR, Patumsawad S, (2001).** Co-combustion of waste from olive oil production with coal in a fluidised bed. *Wastes Management*, 21: 49-53.
- Cordova J, Nemmaoui M, Ismaïli-Alaoui M, Morin A, Roussos S, Raimbault M, Benjilali B, (1998).** Lipases production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5: 75-78.
- Corzo G, Revah S, (1999).** Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technology*, 70: 73-180.
- Crognale S, Federici F, Petruccioli M, (2003).** B-glucan production by *Botryosphaeria rhodina* on undiluted olive mill wastewaters. *Biothechnology Letters*, 25: 2013-2015.
- Crognale S, D'Annibale A, Federici F, Fenice M, Quarantino D, Petruccioli M, (2006).** Olive oil mill wastewater valorisation by fungi. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81: 1547-1555.
- Dalmau E, Montesinos JL, Lotti M, Casas C, (2000).** Effect of different carbon source on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 657-663.
- Dalmau E, Sánchez A, Montesinos JL, Valero F, Lafuente FJ, Casas C, (1998).** Study of the drop size frequensis in a microbial growth system with an aqueous-organic culture medium: lipase production from *Candida rugosa*. *Journal of Biotechnology*, 59: 183-192.
- D'Annibale A, Crestini C, Vinciguerra V, Giovannozzi Sermanni G, (1998).** The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology*, 61: 209-218.
- D'Annibale A, Stazi SM, Ricci M, Marabottini R, Falesiedi G, Sermanni GG, (2003).** Use of ligninolytic fungi and isolated enzymes to perform olive-mill wastewater disposal and detoxification. *Recent Research Developments in Biotechnology and*

Bioengineering, 5: 13-27.

Dauber SR, Boehnke B, (1993). Germany Patent DE-4141832; 1993.

De Azeredo LA, Gomes PM, Sant'Anna GL jr, Castilho LR, Freire DMG, (2007). Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentation. *Current Microbiology*, 54: 361-365.

Del Rio JL, Serra P, Valero F, Poch M, Solà C, (1990). Reaction scheme of lipase production by *Candida rugosa* growing on olive oil. *Biotechnology Letters*, 12: 835-838.

Demicheli M, Bontoux L, (1996). Survey on current activity on the valorization of by-products from the olive oil industry. Final Report of European Commission DG XII.

Diezfalussy MA, Hellman U, Alexon SEH, (1997). Isolation of carboxylester lipase (CEL) isoenzymes from *Candida rugosa* and identification of the corresponding genes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 348: 1-8.

Di Giovacchino L, (1994). Risultati quali-quantitativi dell'estrazione dell'olio dalle olive con il sistema della centrifugazione e confronto con i processi tradizionali. Istituto sperimentale per l'elaiotecnica, Pescara.

Di Giovacchino L, Costantini N, Di Febo M, (1994). La centrifugazione della pasta di olive senza acqua di diluizione. *Rivista Italiana Sostanze Grasse*, 71: 555-559.

Dionisi D, Crucci G, Petrangeli Papini M, Riccardi C, Magone M, Carrasco F, (2005). Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Research*, 39: 2076-2084.

Dominguez de Maria P, (2002). Influence of the fermentation conditions in the production of lipases of *Candida rugosa*, and in their synthetic activity and enantioselectivity in non-conventional organic reactions. *PhD Thesis*, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

Dominguez de Maria P, Sanchez-Montero JM, Alcantara AR, Valero F, Sinisterra JV, (2005a). Rational strategy for the production of new crude lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnology Letters*, 27: 499-503.

Dominguez de Maria P, Sanchez-Montero JM, Sinisterra JV, Alcantara AR, (2006). Understanding *Candida rugosa* lipase: an overview. *Biotechnology Advances*, 24: 180-196.

Druet D, Abbadi NE, Comeau LC, (1992). Purification and characterization of the extracellular and cell-bound lipases from *Penicillium cyclopium* variety. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37: 745-749.

- Du W, Xu YY, Zeng J, Liu DH, (2004).** Novozym 435-catalysed transesterification of crude soya bean oils for biodiesel production in a solvent-free medium. *Biotechnonology and Applied Biochemistry*, 40: 187-190.
- Dubois N, Hamilton JK, Gillis K, Rebers P, Smith F, (1956).** Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Eijkman C, (1901).** Uber enzyme bei bakterien und schimmelpizen. *Cbl Bakt Parasitenk Infektionskr*, 29: 841-848.
- Elibol M, Ozer D, (2000).** Influence of oxygen on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, 36: 325-329.
- Entressangles B, Sari H, Densuelle P, (1966).** On the positional specificity of pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 125: 597.
- Espinosa E, Sánchez S, Farrés A, (1990).** Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. *Biotechnology Letters*, 12: 209-214.
- Farahat SM, Rabie AM, Faras AA, (1990).** Evaluation of the proteolytic and lipolytic activity of different *Penicillium roqueforti* strains. *Food Chemistry*, 36: 169-180.
- Federici F, Petruccioli M, (1985).** Effect of some cultural conditions on polygalacturonase. Production by *Cryptococcus albidus*, var. *albidus*. *Annals of Microbiology*, 35: 235-242.
- Federici F, Petruccioli M, Montedoro GF, Begliomini AL, Servili M, (1991).** Combined phisico-chemical and biological treatment of olive vegetation waters in pilot plant scale. “Vth Forum for Applied Biotechnology”, Gent 25-27 September 1991, 1573-1577.
- Fenice M, Giovannozzi Sermanni G, Federici F, D’Annibale A, (2005).** Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive-mill wastewater based media. *Journal of Biotechnology*, 100: 77-85.
- Fernandez-Bolanos J, Rodriguez R, Heredia A, Guillen R, Jimenez A, (2002).** Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of the two-phase olive oil processing or ‘alperujo’. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6804-6811.
- Ferrer P, Montesinos JL, Valero F, Solà C, (2001).** Production of native recombinant lipases by *Candida rugosa*. *Applied Biotechnology and Biotechnology*, 95: 221-255.
- Fischer BE, Kleber HP, (1987).** Isolation and characterization of the extracellular lipase of *Acinetobacter calcoaceticus* 69V. *Journal of Basic Microbiology*, 27: 427-432.

- Fki I, Allouche N, Sayadi S, (2005).** The use of polyphenolic extracts, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenil acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, 93: 197-204.
- Florenzano G, (1986).** Rapporti tra piante e microrganismi cap XVI. In: *Fondamenti di microbiologia del suolo*, Reda eds. Per l'agricoltura.
- Foglia TA, Villeneuve P, (1997).** Carica papaya latex-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols. *Journal of American Chemical Oil Society*, 74: 1447-1450.
- Freire DMG, Teles EMF, Bon ESP, Sant'Anna GI jr, (1997).** Lipase production by *Penicillium restrictum* in a laboratory-scale fermentor: media composition, agitation and aeration. *Applied Biochemistry and biotechnology*, 63: 409-421.
- Gamba C, Piovanelli C, Papini R, Pezzarossa B, Ceccarini L, Bonari E, (2005).** Soil microbial characteristics and mineral nitrogen availability as affected by olive oil waste water applied to cultivated soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36: 937-950.
- Gerhartz W, (1990).** Industrial uses of enzymes. In: *Enzymes in industry-production and application*, Weinheim, Germany: VCH, 77-148.
- Ghamgui H, Karra-Chaabouni M, Gargouri Y, (2004).** 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between *n*-hexane and solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 355-363.
- Gombert AK, Pinto AL, castilho LR, Freire DMG, (1999).** Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*, 35: 85-90.
- Gonzales-Lopez J, Pozo C, Martinez-Toledo MV, Rodelas B, Salmeron V, (1995).** Produccion de polihidroxicanoatos por *Azotobacter chroococcum* H23 en alpechin. *Simposium Obtencion del aceite de Oliva y reciclado de Subproductos*. Granada, Espana, 43.
- González MD, Moreno E, Quevedo-Sarmiento J, Ramoz-Cormenzana A, (1990).** Studies on bacterial activity of waste waters from olive oil mills (alpechin) inhibitory activity of phenolic and fatty acids. *Chemosphere*, 20: 423-432.
- Gordillo MA, Montesinos JL, Casas C, Valero F, Lafuente J, Solà C, (1998).** Improving lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93: 131-142.

- Gordillo MA, Obradors N, Montesinos JL, Valero F, Lafuente J, Solà C, (1995).** Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43: 38-41.
- Grigoriadou D, Androulaki A, Psomiadou E, Tsimidou MZ, (2007).** Solid phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil. *Food Chemistry*, 105: 675-680.
- Grochulski P, Schrag JD, Douthillier F, (1993).** Insight into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 12843-12847.
- Gulati R, Safena RK, Gupta R, Yadov RP, Sheba Davidson W, (1999).** Parametric optimisation of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis *Process Biochemistry*, 35: 459-464.
- Gunawan S, Kasim NS, Ju YH, (2007).** Separation and purification of squalene from soybean oil deodorizer distillate. *Separation and Purification Technology*, in press.
- Gupta R, Rath P, Bradoo S, (2003).** Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 43: 635-644.
- Hamdi M, (1995).** Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochemistry*, 31: 105-110.
- Handelsman T, Shoham Y, (1994).** Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Journal of Genetic and Applied Microbiology*, 40: 435-443.
- Hasan F, Shah AA, Hameed A, (2006).** Industrial applications of microbial lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 235-251.
- Hedrich HC, Isobe K, Stahl BS, (1993).** Matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry applied to multiple forms of lipases. *Analytical Biochemistry*, 211: 288-292.
- Hegedus DD, Khachatourians GG, (1988).** Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnology Letters*, 10: 637-642.
- Helistö P, Korpela T, (1998).** Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme and Microbial Technology*, 23: 113-117.
- Hernaiz MJ, Sanchez-montero JM, Sinisterra JV (1997).** New differences between isoenzymes A and B from *Candida rugosa* lipase. *Biotechnology Letters*, 19: 303-306.

- Hernandez-Martin E, Otero C, (2008).** Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. *Bioresources Technology*, 99: 277-286.
- Holmquist M, (1998).** Insights into the molecular basis for fatty acyl specificities of lipases from *Geotrichum candidum* and *Candida rugosa*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93: 57-65.
- <http://www.au-kbc.org/frameresearch.html>
- <http://www.novozymes.com>
- Hsu AF, Jones K, Foglia TA, Marmer WN, (2002).** Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant greases as biodiesel. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 36: 181-186.
- Huge-Jensen B, Rubano Galluzzo D, Jensen RG, (1988).** Studies on free immobilized lipases from *Mucor miehei*. *Journal of American Oil Chemical Society*, 65: 905-910.
- Ibrahim OC, Nishio N, Nagai S, (1987).** Production of a thermostable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbitol-corn steep liquor medium. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51: 2145-2151.
- Imamura S, Takahashi M, Misaki H, Matsuura K, (1989).** Method and reagent containing lipases for enzymatic determination of triglycerides, West Germany Patent 3,912,226.
- IRSA-CNR, (1971).** Quaderno IRSA, 11, Roma.
- Ito S, Kobayashi T, Ara K, Ozaki K, Kawai S, Hatada Y, (1998).** Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics and structures. *Extremophiles*, 2: 185-190.
- Iwai M, (1990).** Fundamentals and use of enzyme lipase 7. Application of lipase. *Yushi*, 43: 66-72.
- Iwai M, Tsujisaka Y, Okamoto Y, Fukumoto J, (1973).** *Agricultural and Biological Chemistry*, 37: 929.
- Jacobsen T, Jensen B, Olsen J, Alermana K, (1989).** Extracellular and cell-bound lipase activity in relation to growth of *Geotrichum candidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32: 256-261.
- Jacobsen T, Olsen J, Allerman K, (1990).** Substrate specificity of *Geotrichum candidum* lipase preparations. *Biotechnology Letters*, 12: 121-126.
- Jaeger KE, Eggert T, (2002).** Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 390-397.

- Javier Benitez F, Acero JL, gonzales T, Garcia J, (2001).** Organic matter removal from wastewaters of the black olive industry by chemical and biological procedures. *Process Biochemistry*, 37: 257-265.
- Kahar P, Kobayashi K, Iwata T, Hiraki J, Kojima M, Okabe M, (2002).** Production of ϵ -Polylysine in an Air-lift Bioreactor (ABR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 3: 274-280.
- Kalmis E, Sargin S, (2004).** Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat straw substrates containing olive mill waste water. *International biodeterioration and Biodegradation*, 53: 43-47.
- Kamini NR, Iefuji H, (2001).** Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by *Cryptococcus* spp. S-2. *Process Biochemistry*, 37: 405-410.
- Kamini NR, Mala JGS, Puvanakrishnan R, (1998).** Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*, 33: 505-511.
- Karube I, Sode K, (1988).** Biosensors for lipids. In: Applewhite TH, editor. *Proceedings of the World Conference on Biotechnology in the Fats and Oils Industry*, Campaign, USA: American Oil Chemists' Society, 215-218.
- Kawaguchi Y, Honda J, Taniguchi-Morimura K, Iwasaki S, (1989).** The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature*, 341: 164-166.
- Kazlauskas AL, Bornscheuer UT, (1998).** Biotransformations with lipases. In: Rehm HJ, Reed G, editors. *Biotechnology*, Second edition, vol. 8A. Wiley VCH: Weinheim: 37-191.
- Khoufi S, Aloui F, Sayadi s, (2006).** Treatment of olive oil mill wastewater by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion. *Water Research*, 40: 2007-2016.
- Kirchner G, Scollar MP, Klivanov AM, (1985).** Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *Journal of American Chemical Society*, 107: 7072-7076.
- Klibanov AM, Alberti BN, Morris ED, Felshin MN, (1980).** Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste water. *Journal Applied Biochemistry*, 2: 414-421.
- Kwon DY, Rhee JS, (1986).** A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 63: 89, 92.

- Kosaric N, Gray NCC, Cairns WL, (1987).** Introduction: Biotechnology, and the Surfactant Industry. In *Biosurfactants and Biotechnology*, ed. N. Kosaric, W. L. Cairns & N.C.C. Gray. Marcel Dekker, New York, NY, 1-20.
- Kosugi Y, Kamibayashi A, (1971).** *Journal of Fermentation Technology*, 49: 968.
- Kotsou M, Mari I, lasaridi K, Chatzipavlidis I, balis C, Kyriacou A, (2004).** The effect of olive mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology*, 26: 113-121.
- Kretschmer A, Bock H, Wagner F, (1982).** Chemical and phisical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Applied Environmental Microbiology*, 44: 864-70.
- Kucey RMN, Jansen HH, Leggett ME, (1989).** Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in Agronomy*, 42: 199-228.
- Kurita-Water (1994).** Japanese Patent JP-06246295; 1994.
- Lara PV, Park EY, (2004).** Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 270-277.
- Lanciotti R, Gianotti A, Baldi D, Angrisani R, Suzzi G, Mastrocola D, Guerzoni ME, (2005).** Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresources Technology*, 96: 317-322.
- Langrand G, Rondot N, Triantaphylides C, Baratti JC, (1990).** Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases. *Biotechnology Letters*, 12: 581-586.
- Larios A, Garcia HS, Oliart RM, Valerio-Alfaro G, (2004).** Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 373-376.
- Lee YK, Choo CL, (1989).** The kinetics and mechanism of shear inactivation of lipase from *Candida cylindracea*. *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 183-190.
- Lee SG, Hong SP, Sung MH, (1996).** Removal and bioconversion of phenol in waste water by a thermostable beta-tyrosinase. *Enzyme Microbial Technology*, 19: 374-377.
- Levi-Minzi R, Saviozzi A, Riffaldi R, Falzo L, (1991).** Lo smaltimento in campo delle acque di vegetazione. Effetti sulle proprietà del terreno. *Olivae*, 40: 20-25.
- Li TH, Chen TL, (1994).** Enhancement of glucose oxidase fermentation by addition of hydrocarbons. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78: 298-303.
- Li ZY, Ward OP, (1993).** Enzyme catalysed production of vegetable oils containing omega-3 polyunsaturated fatty acid. *Biotechnology Letters*, 15: 185-188.

- Lin SF, Chiou CM, Tsai YC, (1995).** Effect of triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnology Letters*, 17: 959-962.
- Linko YY, Lansa M, Wu X, Uosukainen E, Seppiala J, Linko P, (1998).** Biodegradable products by lipase biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, 66: 41-50.
- Linko YY, Wu XY, (1996).** Biocatalytic production of useful esters by two forms of lipase from *Candida rugosa*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 65: 163-170.
- Liu BL, Kao PM, Tzeng YM, Feng KC, (2003).** Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 410-415.
- Lopez C, Guerra NP, Rua ML, (2000).** Purification and characterisation of two isoforms from *Candida rugosa* lipase B. *Biotechnology Letters*, 19: 303-306.
- Lopez MJ, Moreno J, Ramos-Cormenzana A, (2001).** *Xhantomonas campestris* strain selection for xhantan production from olive mill wastewaters. *Water Research*, 35: 1828-1830.
- Lopez N, Pernas MA, Pastrana LM, Sanchez A, Valero F, Rua ML, (2004).** Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2 and Lip3) in aqueous and organic media. Influences of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. *Biotechnology Progress*, 20: 65-73.
- Lopez MJ, Ramos-Cormenzana A, (1997).** Xanthan production from olive-mill wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38: 263-270.
- Lotti M, Alberghina L, (1996).** *Candida rugosa* lipase isoenzymes. In: Malcata FX editor, *Engineering of/with Lipases*, 1st edition. Dordrecht, the Netherlands, Kluwer Academic Publisher: 115-124.
- Lotti M, Brocca S, Porro D, (2001).** High lipase production by *Candida rugosa* is associated with G1 cell A flow cytometry study. *Biotechnology Letters*, 23: 1803-1808.
- Lotti M, Ponticelli S, Montesinos JL, Brocca S, Valero F, Lafuente J, (1998).** Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93: 143-148.
- Luparini F, (1939).** La fermentazione alcolica delle acque di vegetazione delle olive. *L'Olivicoltore*, 16: 3-12.
- Macedo GA, Lozano MMS, Pastore GM, (2003).** Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipases from *Rhizopus* sp. *Journal of Biotechnology*, 6.

- Macrae AR, (1983).** Lipase catalyzed interesterification of oils and fats. *Journal of American Chemical Oil Society*, 60: 291-294.
- Macris JB, Kourentzi E, Hatzinikolaou DG, (1996).** Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 31: 807-812.
- Maia MMD, Heasley A, Camargo de Moraes MM, Melo EHM, Moraes jr. MA, Ledingham WM, Lima Filho JL (2001)** Effect of cultural condition on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresources Technology*, 76: 23-27.
- Mahadik ND, Puntambekar US, Bastawde KB, Khire JM, Gokhale DV, (2002).** Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 38: 715-721.
- Mahanta N, Gupta A, Khare SK, (2008).** Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresources Technology*, 99: 1729-1735.
- Mantzavinos D, Kalogerakis N, (2005).** Treatment of olive mill effluents. Part I. Organic matter degradation by chemical and biological process. An overview. *Environmental International*, 31: 289-295.
- Mari I, Ehaliotis C, Kotsou M, Balis C, Georgakakis D, (2003).** Respiration profiles in monitoring the composting of by-products from the olive oil agro-industry. *Bioresources Technology*, 87: 331-336.
- Martirani L, Giardina P, Marzullo L, Sannita G (1996).** Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*, 30: 1914-1918.
- Marques IP, (2001).** Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent re-use in irrigation. *Desalination*, 137: 233-239.
- Martin A, Borja R, Garcia I, Fiestas JA, (1991).** Kinetics of methane production from olive mill wastewater. *Process Biochemistry*, 26: 101-107.
- Martinez J, Perez J, Moreno E, Ramos-Cormenzana A, (1986).** Incidencia del efecto antimicrobiano del alpechin en su posible aprovechamiento. *Grasa y Aceites*, 37: 215-223.
- Merril CR, Goldman D, Van Keuren ML, (1984).** Gel proteins stain: Silver stain. In: *Methods in Enzymology*, Jakobi WB editor, 104: 441-447.

- Mesenguer I, Aguilar V, Gonzalez M, Martinez C, (1998).** Extraction and colorimetric quantification of uronic acid of the pectic fraction in fruit and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 11: 285-291.
- Metwally M, Elwy E, Abou-Zeid A, (1995).** Combination effect of lipids, temperature and culture age on growth and lipase production by some fungi. *Delta Journal of Science*, 19: 233-249.
- Millan B, Lucas R, Robles A, Garcia T, De Cienfuegos GA, Galvez A, (2000).** A study on the microbiota from olive-mill wastewater (OMW) disposal lagoon with emphasis on filamentous fungi and biodegradative potential. *Microbiology Research*, 155: 143-147.
- Miranda OA, Salgueiro AA, Pimental MCB, Lima ilho JL, Melo EHM, Duran N, (1999).** Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technology*, 69: 45-147.
- Mittal S, Khanna S, Roy A, Bharatam PV, Chawla HPS, (2005).** *Candida rugosa* lipase mediated multigram synthesis of acid part of S(+)-atliprofen, a new NSAID and molecular modeling studies aimed at predicting selectivity of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 232-238.
- Montgomery DC, (1997).** *Design and Analysis of Experiments*, 4th edition, Wiley, New York, NY.
- Montedoro GF, (1958).** Annali Facoltà Agraria, Università Perugina, vol. XXXIII.
- Montedoro GF, (1973).** Annali Facoltà Agraria, Università Perugina, vol. XXVIII.
- Montedoro GF, (1996).** Innovazione del settore dell'olio d'oliva: stato attuale e prospettive. Atti del convegno "Utilizzo dei residui dei frantoi oleari", Assessorato Provinciale di Viterbo, 28-34.
- Montedoro GF, Begliomini AL, Servili M, Petruccioli M, Federici F, (1993).** Pectinase production from olive vegetation waters and its utilization in the mechanical live-oil extraction process: increased oil yield and improved quality. *Italian Journal of Food Science*, 4: 355-362.
- Montedoro GF, Petruccioli G, Parlatti MV, (1986).** Interventi chimici e fisici sulle acque di vegetazione ed abbattimento parziale del loro tasso di inquinamento. Tavola rotonda "Lo smaltimento delle acque reflue dei frantoi". Spoleto.
- Montesinos JL, Gordillo MA, Valero F, Lafuente J, Solà C, Valdman B, (1997).** Improvement of lipase productivity in bioprocess using a structured mathematical model. *Journal of Biotechnology*, 52: 207-218.

Montesinos JL, Dalmau E, Casas C, (2003). Lipase production in continuous culture of *Candida rugosa*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78: 753-761.

Moriguchi H, Hirata J, Watanabe T, (1990). Microorganism based agent for treatment of organic wastes. *Japanese Patent*. 2: 105, 899.

Morkbak AL, Degn P, Zimmermann W, (1999). Deinking of soy bean oil based ink printed paper with lipases and a neutral surfactant. *Journal of Biotechnology*, 67: 229-236.

Mukherjee KD, (1990). Lipase-catalyzed reactions for modifications of fats and other lipids. *Biocatalysis*, 3: 277-293.

Muralidhar RV, Chirumamila RR, Marchant R, Nigam P (2001). A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources *Biochemical Engineering Journal*, 9: 17-23.

Nahas E, (1988). Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *Journal of Genetic Microbiology*, 134: 227-233.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W, (1988). Improved staining of proteins in polyacrilamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Electrophoresis*, 9: 255-262.

Nishioka M, Joko K, Takama M, (1990). Lipase manufacture with *Candida* for use in detergents. *Japanese Patent*, 292, 281.

Noureddini H, Gao X, Philkana RS, (2005). Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresources and Technology*, 96: 769-777.

Novo, (1985). Patent AU-8432681; 1985.

Obied HK, Allen MS, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K, Stockmann R, (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 823-837.

Obradors N, Montesinos JL, Valero F, Lafuente FJ, Solà C, (1993). Effect of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. *Biotechnology Letters*, 15: 357-360.

Okeke CN, Okolo BN, (1990). The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. *Biotechnology Letters*, 12: 747-750.

Okumura S, Iwai M, Tsujisaka, (1980). *Journal of Biochemistry, Tokyo*, 87: 205.

Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolova F, Franken SM et al., (1992). The alpha/beta-hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5: 197-221.

- Omar IC, Nishio N, Nagai S, (1987).** Production of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* grown on sorbitol-corn steep liquor medium. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51: 2145-2151.
- Ohnishi K, Yoshida Y, Sekiguchi J, (1994).** Lipase production of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77: 490-495.
- Ota Y, Miyairi S, Yamada K, (1968).** Sterol requirements for the lipase production by *Candida cylindracea*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32: 1476-1478.
- Padilla Borja R, Martin A, Fiesta Ros de Urinos JA, Maestro Duran R, (1990).** Efecto di inhibicio en el processo de biomentanizacion del alpechin en bioreactores con microorganismos inmovilizados en diversos tipos de soportes. *Investigation*, 41, 397-403.
- Palocci C, Falconi M, Alcaro S, Tafi A, Puglisi R, Ortuso F, Botta M, Alberghina L, Cernia E, (2007).** An approach to adress *Candida rugosa* lipase regioselectivity in the acylation reactions of trytilated glucosides. *Journal of Biotechnology*, 128: 908-918.
- Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT, (1999).** The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29:119-131.
- Panizza M, Cerisola G, (2006).** Olive mill wastewater treatment by anodic oxidation with parallel plate electrodes. *Water Research*, 40: 1179-1184.
- Papaparaskevas D, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ, (1992).** Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnology Letters*, 14: 397-402.
- Paraskeva P, Diamadopoulos E, (2006).** Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81: 1475-1485.
- Paredes C, Cegarra J, Roig A, Sanchez-Montedoro MA, Bernal MP, (1999).** Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology*, 67: 111-115.
- Parkinson M, (1985).** Bio-surfactants. *Biotechnology Advances*, 3: 65-83.
- Parry RM Jr, Chandan RC, Shahani KM, (1966).** Rapid and sensive assay for milk lipase. *Journal of Dairy Science*, 49: 356-360.
- Pastorino L, Pioli F, Zilli M, Converti A, Nicolini C, (2004).** Lipasi-catalyzed degradation of poly(ϵ -caprolactone). *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 321-326.

- Patel RN, (2003).** Microbial/enzymatic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. *Current Opinion of Drug Discovery & Development*, 6: 902-920.
- Pèrez J, De La Rubia T, Ben Hamman O, Martinez J, (1998).** *Phanerochaete flavidio-alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2726-2729.
- Pernas MA, Lopez C, Pastrana L, Rua ML, (2000).** Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *Journal of Biotechnology*, 84: 163-174.
- Pernas MA, lopez C, Rua ML, Hemoso J, (2001).** Influence of the conformational flexibility on the kinetics and dimerisation process of two *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *FEBS Letters*, 501: 87-91.
- Petrovic SE, Skrinjar M, Becarevic A, Vujicic JF, Banka L, (1990).** Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotechnology Letters*, 12: 299-304.
- Petrucchioli M, Servili M, Montedoro GF, Federici F, (1987).** Produzione di pectinasi da parte di *Cryptococcus albidus* var. *albidus* sviluppato su substrato costituito da acque di vegetazione dei frantoi tal quali o arricchite di residui della coltivazione del girasole. Atti Tavola Rotonda su “Lo smaltimento delle acque reflue dei frantoi”, Spoleto 10 Novembre 1986, 79-86.
- Petrucchioli M, Servili M, Montedoro GF, Federici F, (1988).** Development of a recycle procedure for the utilization of vegetation waters in the olive oil extraction process. *Biotechnology Letters*, 10: 55-60.
- Petrucchioli G., (1989).** Usi agronomici: la fertirrigazione, ‘Dossier acque di vegetazione’. *Agricoltura e Innovazione*, Notiziario dell’Enea, 11: 60-62.
- Petrucchioli M, Brimer L, Cicalini AR, Federici F, (1999).** The linamarase of *Mucor circinelloides* LU M40 and its detoxifying activity on cassava. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 302-310.
- Petrucchioli M, Federici F, (1988).** Extracellular enzyme production in species of the genus *Penicillium*. *Mycologia*, 80: 726-728.
- Petrucchioli M, Gallo Federici R, (1992).** A note on the production of extracellular hydrolytic enzymes by yeast-like fungi and related microorganisms. *Annals of Microbiology*, 42: 81-86.
- Petrucchioli M, Servili M, Montedoro GF, Federici F, (1990).** Fermentazione delle

acque reflue dei frantoi oleari e loro utilizzazione nel processo di estrazione dell'olio. *Biotechnologie*, 29-31.

Pimentel MCB, Krieger N, Coelho LCCB, Fontana JO, Melo EHM, Ledingham WM, Lima Filho JL, (1994). Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49: 59-74.

Pimentel MCB, Melo EHM, Lima Filho JL, Durán N, (1996). Production of lipase free of citrinin by *Penicillium citrinum*. *Mycopathologia*, 133: 119-121.

Pimentel MCB, Melo EHM, Lima Filho JL, Ledingham WM, Durán N, (1997). Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* cultured in a simple and inexpensive medium: heat-denaturation, kinetics, and pH stability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 66: 185-195.

Piotrowska A, Iamarino G, Rao MA, Gianfreda L, (2006). Short-term effects of olive mill waste water (OMW) on chemical and biochemical properties of a semiarid Mediterranean soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 600-610.

Pokorny D, Cimerman A, Steiner W, (1997). *Aspergillus niger* lipases: induction, isolation and characterization of two lipases from a MZKI A116 strain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2: 215-222.

Pokorny D, Friedrich J, Cimerman A, (1994). Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 16: 363-366.

Potoglou D, Kouzeli-Katsiri A, Haralambopoulos D, (2003). Solar distillation of olive mill wastewater. *Renewable Energy*, 29: 569-579.

Puthli MS, Rathod VK, Pandit AB, (2006). Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 27: 287-294.

Raglione M, Bianchi AA, De Simone C, Valeriani V, Campanelli G, Guiducci M, (1997). Effetti del suolo e sulle produzioni derivanti dalla distribuzione di reflui tal quali di frantoi oleari. *Agricoltura e Ricerca*, 168: 31-38.

Ramalingam K, Pennathur G, (2005). Enhanced lipase production by *Candida rugosa* using novel cost-effective substrates. Proc. 229th ACS National Meeting, San Diego, CA, March 13–17, 2005, *American Chemical Society*, Washington (2005): 234.

Ramos-Cormenzana A, Monteoliva-Sanchez M, Lopez MJ, (1995). Bioremediation of alpechin. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 35: 249-268.

Ranalli A, (1989). Il problema dei reflui di frantoio. Aspetti tecnici e normativi. *L'Informatore Agrario*, 16: 29-52.

- Ranalli A, Strazzullo G, (1995).** Acque di vegetazione delle olive. *L'Informatore Agrario*, 50: 57-60.
- Rao PV, Jayaraman K, Lakshmanan CM, (1993).** Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation. 2: Medium optimization and effect of aeration. *Process Biochemistry*, 28: 391-395.
- Rapp P, Backhaus S, (1992).** Formation of extracellular lipase by filamentous fungi, yeast, and bacteria. *Enzyme Microbiology and Technology*, 14: 938-943.
- Reddy DR, (1992).** In: *Industrial Biotechnology*: Malik VS, Sridhar P, editors; Oxford & IBH Publishing Co, New Delhi, 387-404.
- Rivera-Muñoz G, Tinoco-Valencia JR, Sánchez S, Farrés A, (1991).** Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. *Biotechnology Letters*, 13: 277-280.
- Robert PW, Douglas BK, Morris JG, James R, Adams JM, (1989).** Immobilisation of *Candida cylindracea* lipase on a new range of ceramic supports. *Biotechnology Techniques*, 3: 345-348.
- Rodriguez JA, Mateos JC, Nungaray J, Gonzales V, Bhagnagar T, Roussos S, Cordova J, Baratti J, (2006).** Improving lipase production by nutrient sources modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41: 2264-2269.
- Roig A, Cayuela ML, Sanchez-Monedero, (2006).** An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26: 960-969.
- Rua ML, Diaz-Maurino T, Fernandez VM, Otero C, Ballesteros A, (1993).** Purification and characterization of two distinct lipase from *Candida cylindracea*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1156: 181-189.
- Rúa ML, Schmidt-Dannert C, Wahl S, Sprauer A, Schmid RD, (1997).** Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus Thermocatenulatus*. Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of Biotechnology*, 56: 89-102.
- Saadi I, Laor Y, Raviv M, Medina S, (2007).** Land spreading of olive mill wastewater: effects on soil microbial activity and potential phytotoxicity. *Chemosphere*, 66: 75-83.
- Sayadi S, Ellouz R, (1995).** Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Panerochaete chrysosporium* in the decolourization of olive mill waste waters. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 1098-1103.

Saladino R, Bernini R, Mincione E, (2002). Valorizzazione di reflui agroindustriali. *RICHNAC Magazine*.

Samad MYA, Salleh AB, Razak CNA, Ampon K, Yunus WMZW, Basri M, (1990). A lipase from a newly isolated thermophilic *Rhizopus rhizopodiformis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6: 390-394.

Sanchez A, Ferrer P, Serrano A, Valero F, Solà C, Pernas M, Rua ML, (1999a). A controlled fed-batch cultivation for the production of new crude lipases from *Candida rugosa* with improved properties in fine chemistry. *Journal of Biotechnology*, 69: 169-182.

Sanchez A, Ferrer P, Serrano A, Pernas M, Valero F, Rua ML, (1999b). Characterization of the lipase and esterase multiple forms in an enzyme preparation from *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *Enzyme Microbial Technology*, 25: 214-223.

Sanjust E, Pompei R, Rescigno A, Rinaldi A, Scrugli S, Ballero M, (1994). Le acque reflue di frantoio quale substrato per la crescita di quattro specie del genere *Pleurotus*. *Micologia Italiana*, 2: 119-121.

Sarda L, Desnuelle P, (1958). Action de la lipasi pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 30: 513-521.

Scioli C, Vollaro L, (1997). The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Water Research*, 31: 2520-2524.

Schmid RD, Verger R, (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37: 1608-1633.

Schuepp C, Kermasha S, Michalski MC, Morin A, (1997). Production, partial purification and characterization of lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. *Process Biochemistry*, 32: 225-232.

Servili M, Montedoro GF, (1989). Recupero di polifenoli dalle acque di vegetazione delle olive e valutazione del loro potere antiossidante. *Industrie Alimentari*, 28: 14-26.

Sharma R, Soni SK, Vohra RM, Gupta LK, Gupta JK, (2002). Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochemistry*, 37: 1075-1084.

Shaw JF, Chang CH, Wang YJ, (1989). Characterization of three distinct forms of lipolytic enzyme in a commercial *Candida* lipase preparation. *Biotechnology Letters*, 11: 779-784.

- Singleton VL, Sullivan AR, Kramer G, (1971).** An analysis of wine to indicate aging in wood or treatment with wood chips or tannic acid. *American Journal of Enology and Viticulture*, 22: 161-166.
- Soumanou MM, Bornscheuer UT, (2003).** Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 97-103.
- Stenstrom J, Svensson K, Johansson M, (2001).** Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 36: 93-104.
- Stevenson FJ., Amer J, (1966) .** *Oil Chemical Society*, 43: 203.
- Sugiura M, Isobe M, (1975).** Studies on the mechanism of the lipase reaction. II. Comparative studies on the adsorption of the lipases and various proteins at the air-water interface. *Biochimica et Biophysica Acta*, 397: 412-417.
- Sztajer H, Maliszewska I, (1989).** The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnology Letters*, 11: 895-898.
- Tan T, Zhang M, Wang B, Ying C, Deng L (2003).** Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry*, 39: 459-465.
- Tan T, Zhang M, Xu J, Zhang J, (2004).** Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Process Biochemistry*, 39: 1495-1502.
- Tardioli S, Bannè ETG, Santori F, (1997).** Species-specific selection on soil fungal population after olive mill waste-water treatment. *Chemosphere*, 34: 2329-2336.
- Tsai SW, Liu BY, Chang CS, (1996).** Enhancement of (S)-Naproxen ester productivity from racemic naproxen by lipase in organic-solvents. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 65: 156-162.
- Turano E, Curcio S, De Paola MG, Calabrò V, Iorio G, (2002).** An integrated centrifugation-ultrafiltration system in the treatment of olive mill wastewater. *Journal of Membrane Science*, 209: 519-531.
- Uceda Ojeda M, Hermoso Fernandez M, Gonzalez Delgado J, (1993).** Simposium Científico Técnico (Expoliva).
- Valero F, Ayats F, López-Santín J, Poch M, (1988).** Lipase production by *Candida rugosa*: fermentation behaviour. *Biotechnology Letters*, 10: 741-744.

- Valero F, Del Rio JL, Poch M, Solà C, (1991).** Fermentation behaviour of lipase production by *Candida rugosa* growing on different mixtures of glucose and olive oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72: 399-401.
- Van der Walle N, (1927).** Über synthetische wirkung bakterieller lipasen. *Cbl Bakt Parasitenk Infektionskr*, 70: 369-373.
- Vanot G, Deyris V, Guilhem MC, Phan Tan Luu R, Comeau LC, (2001).** Statistical medium optimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 342-345.
- Vassilev N, Fenice M, Federici F, Azcon R, (1997a).** Olive mill waste water treatment by immobilized cells of *Aspergillus niger* and its enrichment with soluble phosphate. *Process Biochemistry*, 32: 617-620.
- Vassilev N, Vassileva M, Azcon R, (1997b).** Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* on olive cake-based medium and its further application in soil-plant system. *Bioresource Technology*, 59: 1-4.
- Vassilev N, Vassileva M, Azcon M, Fenice M, Federici F, Barea JM, (1998).** Fertilizing effect of microbially-treated olive mill waste water on *Trifolium* plants. *Bioresource Technology*, 66: 133-137.
- Vazquez L, Torres CF, Fornari T, Senorans FJ, Reglero G (2007).** Recovery of squalene from vegetable oil sources using countercurrentsupercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 40: 59-66.
- Versaw WK, Cuppett SL, Winters DD, Williams LE, (1989).** An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science*, 54: 1557-1558.
- Villeneuve P, (2007).** Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*, 25: 515-536.
- Vinciguerra V, D'Annibale A, Delle Monache G, Giovannozzi Sermanni G, (1995).** Correlated effects during the bioconversion of waste olive waters by *Lentinus edodes*. *Bioresources Technology*, 51: 221-226.
- Vitolo S, Tetrarca L, Cresci B, (1999).** Treatment of olive oil industry wastes. *Bioresources Technology*, 67: 129-137.
- Wang TSC, Liang CY, Shen CW, (1969).** *Soil Science*, 107: 181.
- Ward OP, (1985).** In: *Hydrolitic Enzymes in Comprehensive Biotechnology*. Edition Pergamon Press: 830-833.

- Whiteley CG, Enongene G, Pletschke BI, Rose P, Whittington-Jones K, (2003).** Co-digestion of primary sewage sludge and industrial wastewater under anaerobic sulphate reducing conditions: enzymatic profiles in a recycling bed reactor. *Water Science Technology*, 48: 29-138.
- Wimborne MP, Rickard PAD, (1978).** Pectinolytic activity of *Saccharomices fragilis* cultured in controlled environments. *Biotechnology and Bioengineering*, 20: 231-242.
- Wise WS, (1951).** The measurement of the aeration of culture medium. *Journal of Genetic Microbiology*, 5: 167-177.
- Wittaveen CFB, van da Vordervoot P, Swart K, Visser J, (1990).** Glucose oxidase overproducing and negative mutants of *Aspegillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33: 683-686.
- Wu HS, Tsai MJ, (2004).** Kinetics of tributyrin hydrolisis by lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 488-493.
- Zajic JE, Seffens W, (1984).** Biosurfactans. CRC Critical Reviews in Biotechnology, 1: 87-107.
- Zenjari B, Nejmeddine a, (2001).** Impact of spreading olive mill wastewater on soil characteristics: laboratori experiments. *Agronomie*, 21: 749-755.
- Zhang HY, Wang X, Ching CB, Wu JC, (2005).** Experimental optimization of enzymatic kinetic resolution of racemic flurbiprofen. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42: 67-71.
- Zorn H, Breithaupt DE, Takenberg M, Schwack W, Berger RG, (2003).** Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. *Enzyme and Microbial technology*, 32: 623-628.

7. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il mio tutor, la dott.essa Silvia Crognale, per la disponibilità che mi ha dimostrato durante il periodo del dottorato, ma anche per i suoi innumerevoli insegnamenti e consigli. Ringrazio il professore Maurizio Petruccioli, il professore Federico Federici, il dott. Alessandro D'Annibale e il professore Massimiliano Fenice che hanno dato un contributo didattico ed esecutivo importantissimo per l'attività di laboratorio e per la scrittura della tesi.

Inoltre, ringrazio tutti i ragazzi del laboratorio di Microbiologia, Annamaria, Stefano, Chiara, Manuela, Inma, Daniele e Mariangela, per l'amicizia e l'aiuto che mi hanno gentilmente offerto durante tutto questo periodo.

Un affettuoso ringraziamento è riservato a tutta la mia famiglia, sempre presente e pronta ad incoraggiarmi.