

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA
TUSCIA DI VITERBO**

**DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E
AGROCHIMICA**

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
BIOTECNOLOGIE DEGLI ALIMENTI
XX CICLO**

**Produzione di vanillina “naturale” mediante l’uso di
biocatalizzatori microbici**

(CHIM/11)

Coordinatore: Prof. Marco Esti

Tutor: Prof. Maurizio Ruzzi

Dott.ssa Francesca Luziatelli

	INDICE	I
	Riassunto	1
	Abstract	2
	INTRODUZIONE	4
1	La vanillina	5
1.1	Impiego della vanillina in campo alimentare	5
1.2	Estrazione della vanillina da fonti naturali	6
1.2.1	Vanilla planifolia	7
1.2.2	Processo di cura (<i>curing</i>) dei baccelli di vaniglia	9
1.2.3	Estrazione dell'aroma di vaniglia	10
1.2.4	Classificazione merceologica	11
1.2.5	Composizione chimica dell'aroma della vaniglia	12
1.3	Produzione di vanillina mediante sintesi chimica	15
1.4	Produzione biotecnologica di vanillina	18
1.4.1	Produzione per via enzimatica	20
1.4.2	Impiego di cellule o tessuti vegetali come biocatalizzatori	21
1.5	Produzione per via microbica	22
1.5.1	Biotrasformazione a partire da stilbeni fenolici	22
1.5.2	Biotrasformazione di aminoacidi aromatici	23
1.5.3	Biotrasformazione a partire da precursori fenilpropenoici	24
1.5.4	Biotrasformazione a partire da eugenolo ed isoeugenolo	26
1.5.5	Biotrasformazione a partire da acido vanillico	28
1.6	Biotrasformazione a partire da acido ferulico	30
1.6.1	Diffusione in natura dell'acido ferulico	30
1.6.2	Degradazione microbica dell'acido ferulico	32
1.7	Degradazione microbica della vanillina	40
1.8	<i>Escherichia coli</i>	40
1.8.1	Utilizzo di <i>E. coli</i> per la produzione di sostanze impiegate in ambito alimentare	42
1.8.2	Bioconversione dell'acido ferulico in vanillina mediante ceppi ricombinanti di <i>E. coli</i>	43
1.9	<i>Pseudomonas</i>	47
1.9.1	<i>P. fluorescens</i> BF13: organizzazione dell'operone del catabolismo dell'acido ferulico ed isolamento del mutante privo di vanillina deidrogenasi	48
1.10	Brevetti sulla produzione biotecnologica di vanillina	51
	MATERIALI E METODI	58
2	Microrganismi utilizzati	59
2.1	Plasmidi	60
2.2	Terreni di coltura, condizioni di crescita e conservazione dei ceppi	61
2.2.1	Terreni colturali	61
2.2.2	Condizioni di crescita	62
2.2.3	Curva di crescita	63

2.3	Bioreattore	63
2.4	Preparazione di cellule competenti e trasformazione	63
2.4.1	Trattamento con CaCl ₂	64
2.5	Analisi molecolare	64
2.6	Reazione a catena della polimerasi (PCR)	65
2.7	Costruzione del vettore di integrazione pFR2	66
2.8	Esperimenti di bioconversione	68
2.8.1	Produzione della biomassa	68
2.8.2	Recupero della biomassa	70
2.8.3	Acido ferulico	70
2.8.4	Tampone di bioconversione	70
2.8.5	Bioconversione	71
2.8.6	Analisi in HPLC	72
2.9	Prodotti chimici	72
3	Scopo della tesi	73
	RISULTATI E DISCUSSIONE	74
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> BF13-1p4(pBB1)	75
	Prove in beuta:	
4.1	Ottimizzazione della produzione della biomassa	76
4.1.1	Stato fisiologico delle cellule ed aggiunta di acido ferulico al mezzo di coltura	76
4.1.2	Effetto del grado di purezza degli ingredienti utilizzati per la preparazione del terreno di coltura sul processo di bioconversione	81
4.1.3	Modalità di induzione	83
4.2	Ottimizzazione delle condizioni di bioconversione	85
4.2.1	Concentrazione ottimale di acido ferulico nel tampone di bioconversione	85
4.2.2	Effetto del pH del mezzo di bioconversione sulla produzione di vanillina	87
	Prove in bioreattore	
4.3	Ottimizzazione della produzione della biomassa	88
4.3.1	Crescita in bioreattore da 2 L	88
4.3.2	Induzione con acido ferulico	89
4.3.3	Influenza del pH del terreno di coltura sul processo di bioconversione	91
4.4	Ottimizzazione dei parametri di bioconversione	93
4.4.1	Aggiunta di fattori nutrizionali al tampone di bioconversione	93
4.4.2	Influenza del grado di purezza del substrato sulla produzione di vanillina	96
4.4.3	Effetto della quantità di biomassa sulla produzione di vanillina	97
4.5	Scale up del processo di produzione della biomassa in fermentatore da 15L	99

4.6	Utilizzo di terreni alternativi per la produzione della biomassa	102
4.6.1	Effetto di aggiunte sequenziali di acido ferulico sulla produzione di vanillina	104
4.7	Modalità di conservazione della biomassa	107
5	Ingegneria metabolica di <i>Escherichia coli</i> per la produzione di biovanillina	109
5.1	Selezione degli integranti	111
5.2	Prove di bioconversione	114
5.2.1	Valutazione delle capacità catalitiche del ceppo ricombinante FR13: ottimizzazione delle temperature di crescita e bioconversione	114
5.2.2	Effetto delle basse temperature sull'efficienza del biocatalizzatore	117
5.2.3	Utilizzo della biomassa per cicli successivi di bioconversione	118
6	Analisi preliminari dei costi	119
	CONCLUSIONI	122
	BIBLIOGRAFIA	126

Riassunto

Questo progetto di dottorato ha riguardato lo sviluppo, mediante tecniche di ingegneria metabolica, di ceppi microbici idonei per la produzione biotecnologica di vanillina da acido ferulico. L'aldeide vanillica, o vanillina, è la molecola che impartisce all'aroma di vaniglia il suo tipico profumo e rappresenta uno dei principali composti aromatizzanti impiegati nell'industria alimentare. Dal momento che l'aroma estratto da fonti naturali (i baccelli curati della *Vanilla planifolia*) è un ingrediente molto costoso (1.400 \$/Kg) e poco abbondante, nei prodotti aromatizzati alla vaniglia (alimenti compresi) si utilizza quasi esclusivamente vanillina ottenuta per sintesi chimica. L'impiego di microrganismi per la produzione biotecnologica di vanillina permetterebbe di ottenere, partendo da materie prime naturali (come acido ferulico, eugenolo o capsaicina), un prodotto etichettabile come "naturale" che potrebbe essere alternativo sia all'aroma ottenuto per via estrattiva che all'additivo ottenuto per sintesi. Per rendere competitivo un processo biotecnologico, per la produzione di vanillina, è fondamentale che i biocatalizzatori che si intende utilizzare siano geneticamente stabili, (essendo la vanillina è un prodotto tossico) ed efficienti. Poiché la vanillina è un intermedio del catabolismo dell'acido ferulico (un composto fenilpropenoico presente in quantità significativa nel materiale lignocellulosico), avvalendosi, di tecniche di ingegneria metabolica, la capacità di convertire l'acido ferulico in vanillina, può essere conferito sia a ceppi in grado di degradare l'acido ferulico che a ceppi incapaci di degradare l'acido ferulico in vanillina. In questo lavoro di tesi, per sviluppare un processo competitivo di conversione dell'acido ferulico in vanillina, sono stati utilizzati due diversi biocatalizzatori: un mutante del ceppo *P. fluorescens* BF13, che ha perso la capacità di ossidare l'aldeide vanillica ad acido vanillico e accumula aldeide vanillica in presenza di acido ferulico; un ceppo di *Escherichia coli*, sviluppato appositamente nell'ambito di questo lavoro di tesi, al quale è stato conferito la capacità di convertire l'acido ferulico in vanillina. La conversione dell'acido ferulico in vanillina è stata ottenuta utilizzando cellule resting, ottimizzando le condizioni di coltivazione della biomassa (terreno di crescita, fonte di carbonio e modalità di crescita), le condizioni di bioconversione (composizione e pH del tampone di bioconversione e temperatura di incubazione) e le modalità di conservazione del biocatalizzatore. Su collaborazione con la GNOSIS S.p.A. con il ceppo ingegnerizzato di *P. fluorescens* sono state effettuate, con successo, prove di

scale-up in fermentatore da 15 L, utilizzando materie prime di grado industriale per la preparazione del terreno di crescita e del mezzo di bioconversione. Utilizzando il ceppo ingegnerizzato di *E. coli*, è stata ottenuta una produzione di 6,6 g di vanillina per litro di coltura, che rappresenta la produttività di vanillina più alta fino ad ora raggiunta con ceppi di *E. coli*.

Abstract

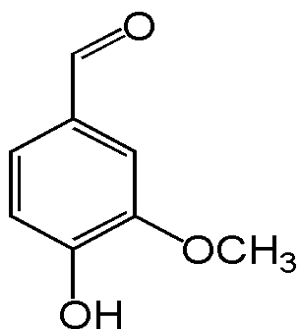
This doctoral project deals with the development of metabolically engineered strains for the production of vanillin from ferulic acid. Vanillic aldehyde, or vanillin, is the molecule that gives vanilla its typical aroma and one of the main compounds used in food flavouring. As the natural aroma extracted from *Vanilla planifolia* pods is very expensive (1400 \$/kg) and rare, chemically synthesized vanillin is used almost exclusively in vanilla-flavoured products (including food). “Biotech-vanillin” produced by microorganisms from natural raw materials such as ferulic acid, eugenol or capsaicin, would allow for a natural alternative to both natural vanilla extract and synthetically produced vanillin. To make the biotechnology process economically competitive, it is essential that the biocatalysts used for the production of vanillin are stable and as efficient as possible. Since vanillin is an intermediate product of the ferulic catabolism, a compound phenylpropanoic acid present in significant quantities in the lignocellulosic material, the aim of this thesis was to compare two microbial biocatalysts able to produce vanillin starting from ferulic acid, using two alternative strategies. The first biocatalyst was the *Pseudomonas fluorescens* strain BF13 which is able to naturally degrade ferulic acid and was previously identified in the biotechnology laboratory at the University of Tuscia. A site-specific mutation was introduced into the gene coding for vanillin dehydrogenase of *P. fluorescens* strain BF13, resulting in a mutant able to convert ferulic acid into vanillin, but unable to oxidise vanillic acid. The second biocatalyst was obtained from a bacterium (*Escherichia coli*) unable to use the vanillin and ferulic acid as sources of carbon. Through metabolic engineering, the ability to produce the enzymes needed to transform ferulic acid into vanillin was conferred onto the *E. coli* strain. The ability of the two microorganisms to efficiently produce vanillin starting from ferulic acid was evaluated in experiments conducted by

means of bioconversion with *resting cells*. Particular attention was paid to the cost of production of biomass which could significantly impact overall costs of the vanillin-production process. Optimal growth conditions (substrate and source of carbon, temperature growth, growth phase) and biomass use (composition of the bioconversion buffer, temperature and pH of the process, pre-treatment of biomass) were identified for both microorganisms.

Successful tests for commercial production of vanillin were carried out for GNOSIS S.p.A., a company interested in the transfer of the process on an industrial scale. Industrial grade raw materials in a 15 L fermentor were used for the preparation of the growth strain and for bioconversion. The best results were obtained by the engineered strain of *E. coli*, which produced 6.6 g of vanillin/L of culture. This value represents the highest production of vanillin obtained to date using biocatalysts from *E. coli*.

INTRODUZIONE

1 La vanillina



L'aldeide vanillica o **vanillina** (4-idrossi-3-metossibenzaldeide, $C_8H_8O_3$) è il principale componente organolettico dell'aroma naturale di vaniglia ed è l'aroma più diffuso ed importante a livello mondiale.

A temperatura ambiente è un solido cristallino bianco (o giallo tenue se poco puro), abbastanza solubile in acqua e nei solventi organici come l'etanolo (500 g L^{-1} a 20°C).

Circa il 60% della vanillina prodotta è utilizzata come aroma nell'industria alimentare e dolciaria, il 33% è impiegata come ingrediente nei profumi, nei cosmetici e nei prodotti per la casa, mentre il 7% è utilizzata in ambito farmaceutico come componente di alcuni farmaci (Priefert *et al.*, 2001).

1.1 Impiego della vanillina in campo alimentare

Come detto in precedenza, l'impiego principale della vanillina è quello nel settore alimentare, in particolare nei gelati, nelle bevande analcoliche, nel cioccolato, nei prodotti di pasticceria, e nei prodotti da forno (budini, torte biscotti etc.).

La vanillina è ampiamente utilizzata anche nella preparazione di prodotti caseari e di liquori e come esaltatore delle qualità organolettiche di caramello o caffè.

Gli aromatizzanti alla vaniglia sono impiegati, unitamente ad altre spezie, per condire carni insaccate fresche, come salsicce, sfruttando in questo modo sia le proprietà aromatizzanti che quelle conservanti proprie della vanillina (Fitzgerald *et al.*, 2004a).

In comune con molti composti fenolici a basso peso molecolare, la vanillina possiede proprietà antiossidanti e soprattutto antimicrobiche che sono sfruttate per la conservazione degli alimenti (Burri *et al.*, 1989; Davidson *et al.*, 2000) per prevenire lo sviluppo dei batteri, (Gram-positivi e Gram-negativi) che determinano il deterioramento degli alimenti. Sulla base degli studi condotti utilizzando *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, e *Listeria innocua*, l'attività inibitoria della vanillina risiede principalmente nell'effetto che esercita sulla integrità della membrana citoplasmatica, con la conseguente riduzione del gradiente protonico e sulla inibizione della attività respiratoria (Fitzgerald *et al.*, 2004b). La vanillina (12mM) può inibire

inoltre la crescita di lieviti responsabili del deterioramento degli alimenti, quali *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hansenni* e *Zygosaccharomyces bailii*, sia in terreni colturali che in purea di mela per almeno 40 giorni (Cerrutti *et al.*, 1996).

L'aggiunta di sorbato di potassio (2mM) alla vanillina (3mM) permette di inibire, per un mese, la crescita di 3 specie di *Penicillium*: (*P. digitatum*, *P. glabrum*, e *P. italicum*) in terreni agarizzati contenenti patata destrosio (Matamoros-León *et al.*, 1999).

1.2 Estrazione della vanillina da fonti naturali

La vanillina naturale può essere estratta dai baccelli curati di una orchidea tropicale originaria del Messico, la *Vanilla planifolia* (conosciuta anche con il nome di *Vanilla fragrans*), coltivata in numerose aree tropicali, soprattutto nel Madagascar che rappresenta il principale produttore mondiale di vanillina naturale (Tabella 1, UN Food & Agriculture Organization-FAO, 2005).

Il consumo mondiale di aroma di vaniglia è di circa 12.000 tonnellate annue, di cui solo l'1% è costituito dal composto ottenuto per via estrattiva (Walton *et al.*, 2003).

Tabella 1: Produzione mondiale annua di baccelli di vaniglia.

Nazione	Produzione annua (tonnellate)
Madagascar	6.200
Indonesia	2.399
Cina	1.000
Messico	189
Turchia	170
Comore	140
Tonga	130
Belgio	100
Uganda	70
Polinesia francese	50
Réunion	35
Malawi	20
Zimbabwe	10
Portogallo	10
Kenya	8
Guadalupa	8

1.2.1 Vanilla planifolia

La *Vanilla planifolia* è un robusto rampicante che cresce nei climi tropicali caldo-umidi caratterizzati da precipitazioni distribuite uniformemente in tutto l'anno e da temperature comprese tra 24 e 30°C.

La pianta ha uno stelo carnoso e liscio e produce una radice avventizia che si aggrappa tenacemente all'albero ospite allo stato naturale, o ai sostegni quando è coltivata.

Le foglie sono alternate lungo i lati del gambo, sono piatte, intere, ovali con la punta aguzza, lunghe 10-23 cm e larghe 4-6 cm di colore verde chiaro.



I fiori, in gruppi di otto o dieci, formano dei piccoli bouquet di colore bianco, verdastro o giallo pallido.

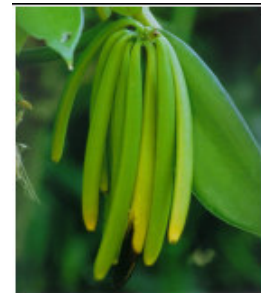
La pianta di solito non fiorisce prima di aver raggiunto i tre metri di altezza, in genere dopo 3 anni, e in un clima ottimale può rimanere produttiva per 6-8 anni; dopo tale periodo si ha una diminuzione della produttività ed il suo sfruttamento non risulta più conveniente.

E' stato osservato che la fioritura della vaniglia dura solo 24 ore e l'emissione del polline avviene per un breve periodo della giornata che dura circa tre ore (dalle 8 alle 11 del mattino).

La fecondazione nelle regioni d'origine è effettuata grazie a degli insetti del genere *Melipona*, che appartengono alla famiglia delle Apidae, privi di pungiglione, che perforano gli organi del fiore esterni trascinando il polline sullo stamma.

Dopo la fecondazione, sono necessari dai 10 ai 12 mesi affinché si completi la maturazione dei baccelli; durante il quale l'ovario che serve da picciolo alla base del fiore, si trasforma in grosso pendente di forma cilindrica tripartita, lungo da 12 a 25 cm e largo 1-1,5 cm.

I baccelli freschi e ancora inodori, contengono migliaia di grani minuscoli che saranno liberati per deiscenza dei frutti maturi se non si provvedesse a raccogliarli ancora verdi (Ramachandra Rao e Ravishankar, 2000).



Gli insetti impollinatori si trovano solo nel Messico, ma lontano dai luoghi di origine il trasferimento del polline allo stamma viene effettuato artificialmente utilizzando un bastoncino di bamboo (Figura 1). L'impollinazione artificiale richiede operatori molto esperti che riescono ad impollinare circa 1000-1500 fiori al giorno. Una pianta produce da 4 a 10 grappoli, cioè tra 40 e 120 baccelli per anno. Servono circa 5 Kg di vaniglia verde per ogni Kg di vaniglia preparata. Una buona piantagione produce tra 500 e 800 Kg di vaniglia preparata per ettaro e questo per una durata media di 8 anni.

Figura 1: Impollinazione manuale del fiore della vaniglia.



1.2.2 Processo di cura (*curing*) dei baccelli di vaniglia

Per la produzione di vanillina naturale, i baccelli vengono raccolti prima della maturazione, quando sono ancora verdi. I baccelli freschi hanno un odore acre e sviluppano il loro caratteristico aroma e colore (marrone) solo dopo il processo di cura (*curing*).

Il periodo della raccolta dei baccelli varia nelle singole regioni di coltivazione: Maggio-Giugno in Madagascar; Aprile-Giugno nelle Isole Comore; Aprile-Luglio Thailandi.

La produzione dell'aroma di vaniglia prevede quattro fasi:

Durante la prima fase detta “*Killing*” i tessuti del baccello vengono distrutti con lo scopo di bloccare la crescita vegetativa e per liberare gli enzimi necessari per la formazione delle sostanze che costituiscono il tipico aroma. La distruzione delle strutture cellulari può avvenire utilizzando acqua bollente, mediante appassimento al sole o in forni, per scarnificazione, mediante trattamenti con gas di etilene o mediante congelamento.

Nella seconda fase “*Sweating*” il tasso di umidità dei baccelli viene mantenuto basso per impedire lo sviluppo di microrganismi contaminanti. Durante questo processo che dura dai 7 ai 10 giorni l'attività enzimatica, che raggiunge i livelli più elevati, determina il rilascio dai precursori glucosidati dei composti caratterizzanti dell'aroma. L'ossidazione dei composti polifenolici determina il colore marrone caratteristico dei baccelli.

Alla fine del periodo di *sweating* i baccelli curati hanno ancora un contenuto elevato di umidità ($600-700 \text{ g Kg}^{-1}$), e necessitano quindi di un ulteriore periodo di essiccamento (*drying face*) per proteggerli dal deterioramento microbico, alla fine del quale i baccelli perdono circa un terzo del loro peso originale.



Nell'ultima fase, che prende il nome di “*Conditioning*”, i baccelli vengono conservati in casse di legno per almeno 30 giorni. Durante questo periodo avvengono reazioni chimiche e biochimiche come esterificazione, eterificazione e degradazione, che portano alla formazione di composti volatili che caratterizzano l'aroma della vaniglia (Ramachandra Rao e Ravishankar, 2000).

Il più importante procedimento, tipico delle isole bagnate dall'Oceano Indiano (Madagascar, Isole Comore), per realizzare il processo di curing dei baccelli di

vaniglia, è il metodo “Bourbon”, mentre in Indonesia viene utilizzato anche il metodo “Messicano”. La scelta del metodo di “curing” dipende da numerosi fattori, come la localizzazione geografica del paese produttore, le condizioni climatiche e le tradizioni locali.

Il metodo “Messicano” prevede la conservazione dei baccelli in capannoni collocati in pieno sole, dove rimangono fino a quando non iniziano ad avvizzire. Dopodiché i baccelli vengono raccolti e conservati in contenitori di mogano ricoperti con stuoie, per mantenere costante la temperatura e favorire le reazioni enzimatiche. Durante questo periodo i baccelli iniziano ad assumere il loro caratteristico colore marrone-cioccolato e la loro umidità viene ridotta a valori ottimali (25%) grazie alle frequenti esposizioni ai raggi solari. I baccelli a questo punto vengono posti in casse di invecchiamento per 2-3 mesi, avvolti in carta cerata ed imballati in speciali contenitori. L'intero processo ha una durata di 5-6 mesi (Merory, 1968).

Nel metodo “Bourbon” i baccelli vengono posti in acqua calda a 80°C per 7-15 minuti, dopodiché il materiale viene lasciato ad essiccare su teli per 10 giorni.

Dopodiché i teli contenenti i baccelli vengono arrotolati per favorire le reazioni enzimatiche. Alla fine i baccelli vengono selezionati ed imballati in apposite scatole. L'intero processo che ha una durata di 35-40 giorni viene eseguito principalmente in Madagascar (Rosegarten, 1969).

1.2.3 Estrazione dell'aroma di vaniglia

La fase che segue il processo di cura è l'estrazione delle sostanze contenute nei baccelli mediante l'impiego di solventi organici.

Il metodo di estrazione più utilizzato e diffuso è quello che utilizza una miscela idro-alcolica addizionata con saccarosio e glicerina. Le sostanze che vengono addizionate al solvente organico hanno la funzione di addolcire e di rendere denso l'estratto, che deve contenere una concentrazione minimo di alcol etilico pari al 35%.

La concentrazione dell'estratto viene espressa in “fold” [estrazione con 1 parte (in peso) di baccelli di vaniglia e 10 parti di miscela d'estrazione idro-alcolica (in peso)].

L'estrazione della vanillina dai baccelli curati, può avvenire con due diversi approcci metodologici: il metodo della percolazione ed il metodo dell'oleoresina.

Il primo viene realizzato facendo percolare un solvente costituito da acqua ed etanolo (35-50:65-50 v/v) sui baccelli sotto vuoto e consente di ottenere al massimo un estratto 4-fold. Questo processo richiede dalle 48 alle 72 ore.

Nel metodo dell'oleoresina, che richiede 8-9 giorni, l'etanolo viene fatto circolare sui semi polverizzati e l'eccesso di alcol viene rimosso per evaporazione (Goodenough, 1982). Nonostante il processo sia più lungo rispetto a quello della percolazione, il metodo dell'oleoresina consente di ottenere un estratto che può arrivare a 10 fold.

Terminato il processo di estrazione si opera una chiarificazione, mediante centrifugazione o filtrazione alla quale segue un periodo di stagionatura di circa 1 anno. Commercialmente l'aroma naturale viene venduto come estratto diluito di etanolo (Prince *et al.*, 1994).

Il processo di estrazione dell'aroma di vaniglia a partire dall'orchidea *V. planifolia* è caratterizzato da tempi molto lunghi e notevoli investimenti in termini sia economici che di manodopera, ragioni che giustificano l'elevato prezzo di vendita dell'aroma naturale di vaniglia.

1.2.4 Classificazione merceologica

Per stabilire il valore commerciale dei baccelli di vaniglia oltre al contenuto in vanillina sono considerati anche altri parametri quali: lunghezza dei baccelli, aroma, colore, umidità, consistenza, assenza di macchie, di insetti infestanti e di muffe.

In relazione a queste caratteristiche i baccelli (varietà Bourbon) vengono incluse nelle seguenti categorie commerciali:

- a) **Extra:** baccelli interi di colore marrone cioccolato uniformi, senza macchie e fessurazioni, oleosi con aroma delicato,
- b) **1^a classe:** aroma equilibrato, lunghezza dei baccelli maggiore di 14 cm, flessibilità, assenza di macchie e fessurazioni, colore marrone cioccolato, umidità minore del 25%. I baccelli sono meno oleosi rispetto alla qualità extra,
- c) **2^a classe:** buon aroma, lunghezza maggiore di 14 cm, flessibilità, presenza di alcune macchie e fessurazioni, umidità compresa tra il 25 e il 28%,

- d) **3^a classe:** aroma equilibrato, lunghezza maggiore di 14 cm, flessibilità, con macchie di colore rosso e fessurazioni, umidità superiore al 30%,
- e) **4^a classe:** baccelli con spaccature di lunghezza inferiore ai 14 cm, macchie di colore rosso, umidità superiore al 30%,
- f) **Inferiore:** baccelli poco umidi e di colore rosso.

I baccelli che non rientrano in queste categorie, perché troppo piccoli, rotti o eccessivamente incurvati, sono inseriti in un altro raggruppamento noto come “bulk” (Reineccius, 1994).

1.2.5 Composizione chimica dell'aroma della vaniglia

L'aroma naturale di vaniglia è una complessa miscela di composti volatili (circa 200).

I principali costituenti che partecipano allo sviluppo delle peculiari caratteristiche aromatiche sono: la vanillina, l'acido vanillico, l'alcool vanillico, la *p*-idrossi-benzaldeide, l'acido *p*-idrossi-benzoico (Figura 2).

Nella tabella 2 vengono riportate le quantità in grammi delle principali sostanze presenti in un Kg di baccelli di vaniglia (peso secco) (Ramachandra Rao e Ravishankar, 2000).

Attraverso il processo di cura i baccelli acquisiscono l'aroma tipico come risultato di reazioni enzimatiche, che avvengono naturalmente all'interno del baccello. Nei baccelli verdi, i componenti aromatici, sono presenti sotto forma di glucosidi, convertiti dagli enzimi β -glucosidasi nei vari componenti dell'aroma vaniglia; quelli più abbondanti sono la glucovanillina e il glucoside dell'alcol vanillico.

Altri enzimi attivi nel baccello di vaniglia, durante il periodo di crescita di 5 mesi, sono proteasi, perossidasi, polifenolossidasi, cellulasi ed emicellulasi; l'attività proteolitica diminuisce col trascorrere del tempo, mentre è presente un aumento dell'attività perossidasi a partire dal terzo mese; le attività polifenolossidasica e glucosidasica invece non aumentano in modo rilevante (Mane e Zucca, 1993).

Si è ipotizzato che gli enzimi glucosidasici possano catalizzare l'idrolisi della coniferina (glucoside dell'alcol coniferilico), in glucosio e alcool coniferilico, e l'ossidazione di quest'ultimo può portare alla produzione di vanillina. Alternativamente

la vanillina è ottenuta dal suo precursore glucovanillina sempre attraverso l'azione di una β -glucosidasi.

La Figura 3 mostra la via biosintetica con la quale verrebbe sintetizzata la glucovanillina nel baccello verde di vaniglia (Ranavide, 1994).

Figura 2: Struttura molecolare dei principali composti aromatici presenti nell'aroma di vaniglia.

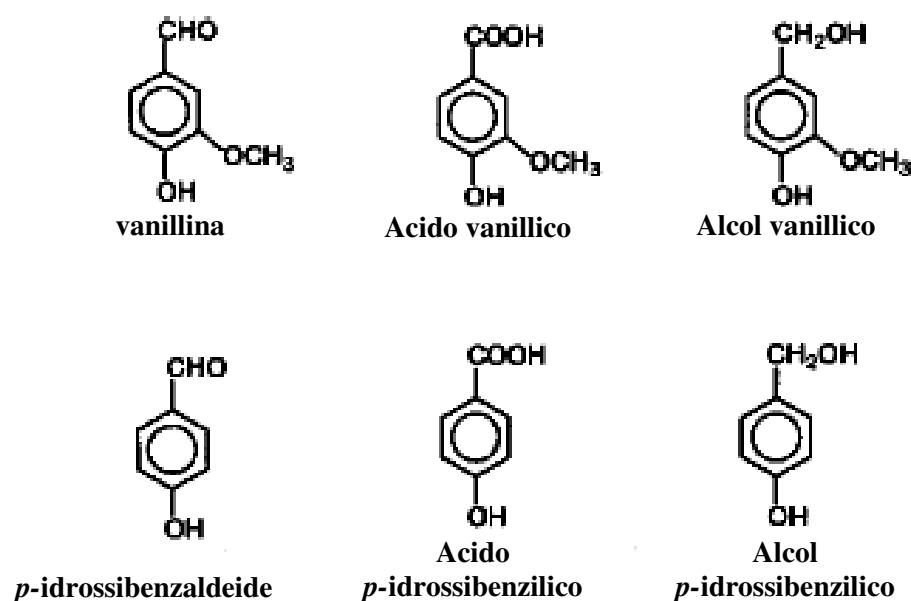
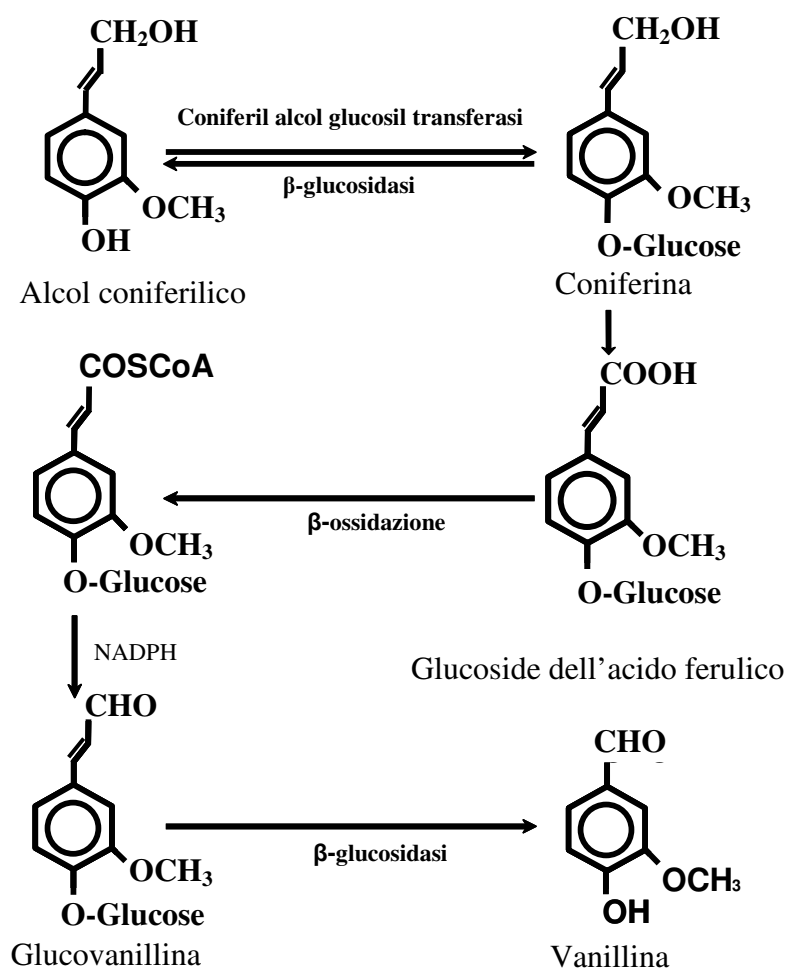


Tabella 2: Principali componenti dei baccelli curati di vaniglia.

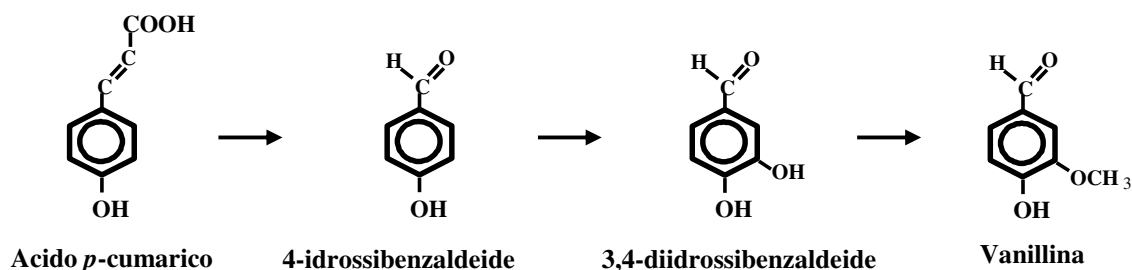
Componenti	g Kg ⁻¹ (peso secco)
Aldeide vanillica	20
Acido vanillico	1
<i>p</i> -idrossibenzaldeide	2
<i>p</i> -idrossibenzilmetiletere	0,2
Zuccheri (glucosio; fruttosio)	250
Grassi (acido oleici; acido palmitico)	150
Cellulosa	150-300
Minerali	60
Acqua	350

Figura 3: Via metabolica proposta per la sintesi della glucovanillina nel baccello verde di *Vanilla fragrans* (Ranavide, 1994).



Più recentemente, è stato proposto, un meccanismo alternativo che prevede la biosintesi da vanillina a partire da acido *p*-cumarico. Secondo questo meccanismo l'acido *p*-cumarico viene convertito in 4-idrossibenzaldeide, in seguito all'accorciamento della catena laterale e quest'ultimo idrossilato a 3,4-diidrossibenzaldeide. Infine il gruppo idrossilico in posizione 3 viene metilato a vanillina (Pak *et al.*, 2004, Figura 4).

Figura 4: Via metabolica proposta per la biosintesi della vanillina in *Vanilla fragrans* (Pak *et al.*, 2004).



1.3 Produzione di vanillina mediante sintesi chimica

Da molto tempo la vanillina utilizzata a livello industriale ed alimentare, è prodotta, quasi esclusivamente, per sintesi chimica a partire da guaiacolo, lignina, coniferina, alcol coniferilico e da eugenolo. La vanillina sintetica soddisfa circa il 99% del mercato mondiale degli aromatizzanti alla vaniglia, anche se alcune nazioni, come la Francia rappresentano un'eccezione, poiché utilizzano un'elevata percentuale di aroma naturale di vaniglia (pari a circa il 50% del loro fabbisogno), allo scopo di soddisfare il mercato interno.

Attualmente circa il 50% della produzione mondiale di vanillina sintetica viene utilizzata come intermedio nell'industria chimica e farmaceutica per la produzione di erbicidi, agenti antischiuma e di neurofarmaci (Hocking, 1997). La vanillina sintetica viene utilizzata anche per la preparazione di prodotti per la casa, come deodoranti per l'ambiente e cere per pavimenti.

L'utilizzo di vanillina sintetica in alternativa al prodotto ottenuto per via estrattiva è determinato essenzialmente da motivi di natura economica, in quanto il ridotto di sintesi costa 1/100 di quello estratto dai baccelli curati della pianta di vaniglia.

a) Sintesi chimica a partire da coniferina

Il processo per la produzione di vanillina a partire da coniferina ottenuta dalla linfa delle conifere appena abbattute è stato sviluppato da Haarmann e Tiemann nel 1874.

La vanillina viene ottenuta per ossidazione della coniferina in presenza di bicromato di potassio ed acido solfidrico. Il processo, che forniva una resa in vanillina di 350g Kg^{-1} , è stato oggi abbandonato poiché ritenuto antieconomico rispetto ai processi sviluppati in seguito.

a) Sintesi chimica a partire da guaiacolo

Un metodo competitivo dal punto di vista economico è la condensazione di guaiacolo con acido gliossilico, seguita da ossidazione del risultante acido mandelico al corrispondente acido fenilgliossilico che viene in fine decarbossilato a vanillina. La condensazione tra guaiacolo ed acido gliossilico si svolge a temperatura ambiente in un mezzo blandamente alcalino. Un'accortezza che occorre utilizzare per il buon esito del processo è quella di condurre la reazione in eccesso di guaiacolo, per evitare la formazione di sottoprodotti indesiderati (prodotti bisostituiti). La soluzione alcalina contenente acido 4-idrossi-3-metossimandelico viene ossidata con aria in presenza del catalizzatore (nitrobenzene o ossido di zinco). La vanillina viene quindi ottenuta in seguito ad acidificazione e contemporanea decarbossilazione dell'acido 4-idrossi-3-metossifenilgliossilico. Il prodotto prima di essere immesso sul mercato è sottoposto ad un trattamento di distillazione sottovuoto e di cristallizzazione per eliminare le impurezze presenti (Ramachandra Rao e Ravishankar, 2000).

b) Sintesi chimica a partire da lignina

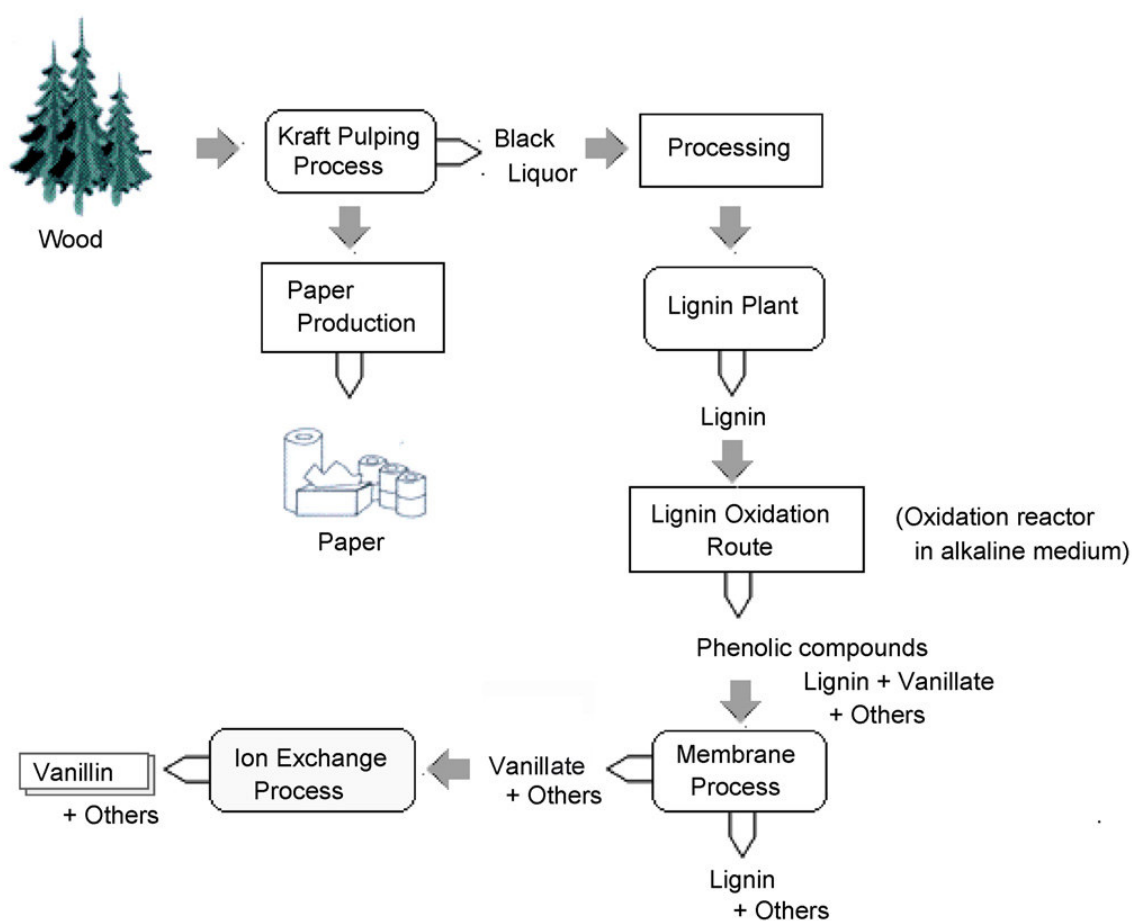
La lignina è un polimero costituita da unità ripetute di fenilpropano. Si trova principalmente nella parete cellulare di alcune cellule vegetali. Le lignine sono per quantità i secondi biopolimeri sintetizzati sulla terra dopo la cellulosa. La biomassa formata da cellulose e le lignine rappresenta circa il 70% della biomassa totale.

La lignina è utilizzata principalmente come combustibile, ma attualmente trova largo impiego nell'industria come disperdente, indurente, emulsionante per laminati plastici, cartoni e manufatti in gomma. Inoltre essendo tra le più abbondanti fonti naturali di composti aromatici, la lignina presente nei reflui dell'industria cartiera, viene largamente impiegata per la produzione della vanillina industriale.

Gli scarti solfonici dell'industria della carta contengono acido ligninsulfonico che trattato ad alta temperatura e pressione, in ambiente alcalino, con agenti ossidanti si

decompone in diversi prodotti come la vanillina, si formano inoltre altri prodotti di reazione come il guaiacolo, la *p*-idrossibenzaldeide, la deidrodivanillina ed acidi aromatici. Dopo filtrazione su membrana viene recuperato un permeato ricco di sodio vanillato, dal quale la vanillina viene recuperata mediante cromatografia a scambio ionico (Zabkova *et al.*, 2006; Figura 5).

Figura 5: Processo di ossidazione della lignina e recupero della vanillina sintetica.



In generale il recupero della vanillina dalla soluzione formata in seguito ad ossidazione rappresenta una tappa molto importante. La concentrazione della vanillina in soluzione non può essere incrementata per evaporazione a causa dell'elevato contenuto di solidi e la vanillina presente sottoforma di sodio vanillato è difficile da estrarre.

c) Sintesi chimica a partire da eugenolo

L'eugenolo ($C_{10}H_{12}O_2$) è un composto aromatico idrossilato. Si tratta di un liquido oleoso, di colore quasi trasparente o giallo chiaro, che viene estratto da alcuni oli essenziali, specialmente dall'olio di chiodo di garofano e dalla cannella. È poco solubile in acqua e solubile nei solventi organici.

Esistono tre diversi metodi per la sintesi di vanillina a partire da eugenolo (Ramachandra Rao e Ravishankar, 2000):

1. Isomerizzazione dell'eugenolo ad isoeugenolo con idrossido di potassio in glicole dietilenico. L'isoeugenolo viene convertito ad acetato e poi ossidato a vanillina, utilizzando come catalizzatore perossido di osmio. La vanillina viene recuperata dopo acidificazione;
2. Ossidazione dell'isoeugenolo a vanillina con pentossido di vanadio come catalizzatore e acqua ossigenata in *terz*-butiletere;
3. Ossidazione dell'eugenolo con nitrobenzene in soluzione basica di dimetilsolfossido (DMSO) per ottenere vanillina.

1.4 Produzione biotecnologica di vanillina

Il prezzo della vanillina sintetizzata chimicamente è molto basso (circa 15\$/kg), se confrontato solo con quello dell'aroma di vaniglia (circa 2400 \$/Kg), che contiene il 2% di vanillina.

A far lievitare i costi di produzione dell'aroma naturale concorrono numerosi fattori, come il costo della manodopera indispensabile per l'operazione di impollinazione manuale dei fiori e per la raccolta dei baccelli ed il lungo e laborioso processo di *curing*.

L'aroma naturale di vaniglia è sottoposto ad una concorrenza da parte della vanillina ottenuta per via chimica, che talvolta viene aggiunta in maniera fraudolenta all'estratto naturale di vaniglia allo scopo di accrescere il valore commerciale di estratti scadenti (Butenhorn *et al.*, 1996).

Inoltre, a differenza dell'aroma ottenuto per via estrattiva, la vanillina sintetica ha un elevato contenuto di residui di reazione che ne sconsigliano l'utilizzo in campo alimentare.

Il prezzo elevato dell'aroma di vaniglia estrattiva e l'interesse sempre crescente dei consumatori verso aromi naturali sta stimolando le industrie del settore ad individuare nuove strategie per produrre vanillina naturale da fonti naturali attraverso le biotrasformazioni. Le biotrasformazioni sono reazioni organiche che utilizzano catalizzatori biologici. Questi biocatalizzatori possono essere cellule o enzimi e possono essere utilizzati in condizioni molto differenti: liberi/immobilizzati, in fase acquosa/in sistemi bifasici.

Il vantaggio principale che deriva dall'impiego di questi processi bioproduttivi, è rappresentato dal fatto che, secondo le attuali normative promulgate in campo alimentare dalla Comunità Europea e dagli Stati Uniti (Code of Federal Regulation, 1993), gli aromi ottenuti mediante biotrasformazione di substrati presenti in natura sono a tutti gli effetti equiparati a quelli naturali.

La vanillina ottenuta attraverso metodologie biotecnologiche, a partire da substrati naturali come l'acido ferulico, ha quindi il duplice vantaggio di avere costi di produzione notevolmente più contenuti rispetto all'aroma estratto dalla *V. planifolia*, pur essendo a tutti gli effetti equiparata a quest'ultimo.

Le biotrasformazioni di composti disponibili a basso costo in altri a più elevato valore aggiunto, quale la conversione di acido ferulico in vanillina, sono interessanti applicazioni dell'ingegneria chimica in generale e di quella biotecnologia in particolare. Esse costituiscono anche un importante via per la valorizzazione di risorse naturali o scarti dell'industria agroalimentare, in quanto consentono la conversione di loro costituenti in prodotti naturali di interesse commerciale. Quando poi i prodotti ad elevato valore aggiunto vengono generati dalla bioconversione di componenti di scarto persistenti nell'ambiente o inquinanti, i vantaggi dell'approccio indicato, in termini sia economici che ambientali, sono ancora più evidenti.

1.4.1 Produzione per via enzimatica

Diversi autori hanno descritto l'uso di preparazioni enzimatiche contenenti β -glucosidasi per ottenere rilascio di vanillina dai baccelli di *Vanilla* come valida alternativa al convenzionale processo di cura (Dignum *et al.*, 2001; Ruiz-Ieràn *et al.*, 2001). Enzimi, anche di origine microbica, possono essere usati per produrre vanillina tramite biotrasformazione di molecole derivate da altre piante. Ad esempio, una diossigenasi ricavata da *Pseudomonas* TMY1009 (Kamoda *et al.*, 1989) catalizza la scissione dell'isorapotina, uno stilbene monoglucosilato costituente della corteccia di abete rosso, ed esteri di alcol coniferilico che rappresentano il substrato per una lipossigenasi di soia da cui si ottiene vanillina (Markus *et al.*, 1992).

Nel 2001 Van den Huevel *et al.* utilizzarono la vanillil alcol ossidasi (VAO) di *Penicillium paucimobilis* per bioconvertire in vanillina la capseicina, il principale componente *pungente* del peperoncino rosso; od il cresolo, ottenuto mediante riscaldamento del legno o del catrame di carbone. Questo enzima può produrre vanillina utilizzando diversi substrati:

- alcol vanillico mediante ossidazione,
- metossimetilfenolo mediante demetilazione ossidativa,
- vanillinammina mediante deaminazione ossidativa,
- cresolo mediante idrossilazione ad alcol coniferilico,
- capseicina convertita in alcol vanillico.

La conversione del cresolo avviene in due *step*. Nel primo l'enzima VAO catalizza l'idrossilazione del cresolo ad alcol vanillico e nel secondo *step* l'alcol vanillico prodotto viene ossidato a vanillina dallo stesso enzima.

La capseicina è un altro substrato dell'enzima VAO ed essendo una molecola facilmente reperibile e a basso costo rappresenta un valido substrato per la produzione di vanillina.

La capseicina è prima convertita a vanillilammina ad opera dell'enzima penicillinaG-idrolasi di *E. coli*, che agisce a pH compresi tra 9 e 10,5. La conversione della vanillilammina ad opera di VAO prevede la formazione di un intermedio, la vanillilimmina, che è idrolizzata non enzimaticamente a vanillina.

Negli ultimi anni sono state utilizzate preparazioni enzimatiche di lipossigenasi, ottenute dalla soia, per bioconvertire l'isoeugenolo in vanillina. Aggiungendo carbone attivo sono stati ottenuti 2,46 g L⁻¹ di vanillina con una resa molare del 13,3% (Li *et al.*, 2005).

1.4.2 Impiego di cellule o tessuti vegetali come biocatalizzatori

La possibilità di utilizzare cellule o tessuti vegetali di *Vanilla* per la produzione di vanillina e dei relativi composti aromatici è stata largamente sfruttata negli ultimi anni. L'utilizzo di colture di cellule o tessuti vegetali per la produzione di aromi, è basata sulle loro singolari capacità genetiche e biochimiche e sulla loro totipotenza.

Ogni cellula della pianta di vaniglia contiene infatti le informazioni genetiche necessarie per la sintesi dei vari composti chimici (o loro precursori) che costituiscono l'aroma naturale. In linea di massima queste colture hanno il potenziale di produrre alcuni dei circa 200 composti che si osservano essere presenti nei baccelli curati di *Vanilla*.

Per allestire colture cellulari sono impiegate cellule di *V. planifolia*, prelevate da diversi organi della pianta come radici aeree, foglie e steli. L'idea è stata quella di somministrare intermedi delle vie metaboliche affinché vengano biotrasformati nel composto di interesse ed è stato provato l'utilizzo di inibitori di vie biosintetiche che non portano al composto desiderato.

Nel 1991 Knuth e Sahai dimostrarono che l'aggiunta di fitormoni come l'acido 2,4-diclorofenossiacetico che stimolano la crescita del callo in *Vanilla fragrans* incrementano anche la produzione di vanillina, mentre l'acido naftalenacetico in combinazione con citochinine aumenta la produzione dei fenoli estraibili totali. I principali fattori che influenzano la produzione di vanillina in colture cellulari di *V. fragrans* sono la natura e la concentrazione dei precursori dei componenti della vaniglia che vengono aggiunti al terreno. L'aggiunta di acido ferulico e fenilalanina determinano un lieve incremento della produzione di vanillina, mentre aggiungendo alcol vanillico al terreno si osserva un significativo aumento del contenuto in vanillina. Altre linee di ricerca impiegano colture cellulari che provengono da piante differenti, cellule immobilizzate di *Capsicum frutescens* (peperone) sono in grado di produrre

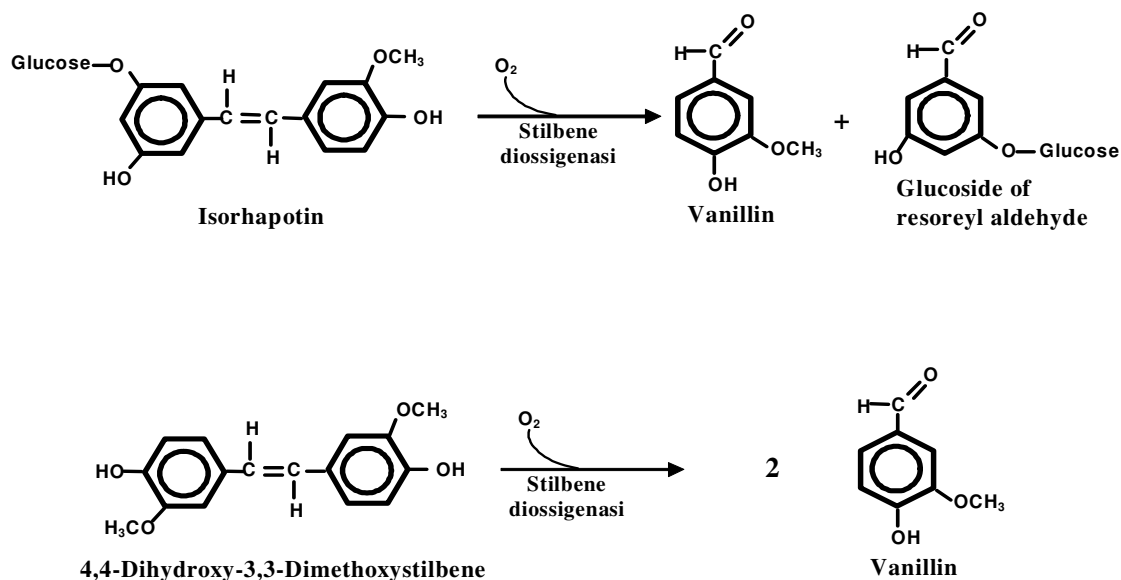
vanillina, se trattate con intermedi fenilpropanoici come, aldeide protocatechica, acido caffeico, acido vanillico e vanillinammina (Johnson *et al.*, 1996). Cellule immobilizzate di *C. frutescens* trattate con aldeide protocatechica, hanno consentito di ottenere dopo 6 giorni di processo 5,63 mg L⁻¹ di vanillina. Un incremento nella quantità di vanillina prodotta, 14,08 mg L⁻¹ dopo 4 giorni di processo, è stata ottenuta aggiungendo al trattamento con aldeide protocatechica, S-adenosil-l-metionina (Rao *et al.*, 2000). Si ha produzione di vanillina anche in seguito al trattamento eugenolo, aldeide coniferilica e veratraldeide, con produzione di metaboliti utili in quantità paragonabili a quelle presenti nel baccello della vaniglia (Ramachandra Rao e Ravishankar, 1999). Gli aspetti negativi di queste strategie produttive sono la bassa stabilità delle linee cellulari, la scarsa velocità di crescita, nonché le limitate rese produttive, problemi che a tutt'oggi rendono queste metodiche poco competitive per la sintesi di biovanillina rispetto all'impiego di biocatalizzatori microbici.

1.5 Produzione per via microbica

1.5.1 Biotrasformazione a partire da stilbeni fenolici

Gli stilbeni fenolici sono composti comunemente presenti nella corteccia dell'abete rosso che possono essere ossidati alla corrispondente aldeide aromatica ad opera dell'enzima stilbene- α - β -diossigenasi (I-V) isolata dal ceppo *Pseudomonas paucimobilis* TMY 1009, come mostrato in Figura 6 (Habu *et al.*, 1989; Shiotsu *et al.*, 1989; Kamoda e Saburi 1993; Kamoda *et al.*, 1997). I geni codificanti per l'enzima sono stati clonati in *Escherichia coli* (Kamoda e Samejima, 1991). Con estratti cellulari di *P. paucimobilis* TMY1009 il composto naturale isorapotina viene ossidato a vanillina con rese del 70%. Questo processo è stato brevettato (Yoshimoto *et al.*, 1990).

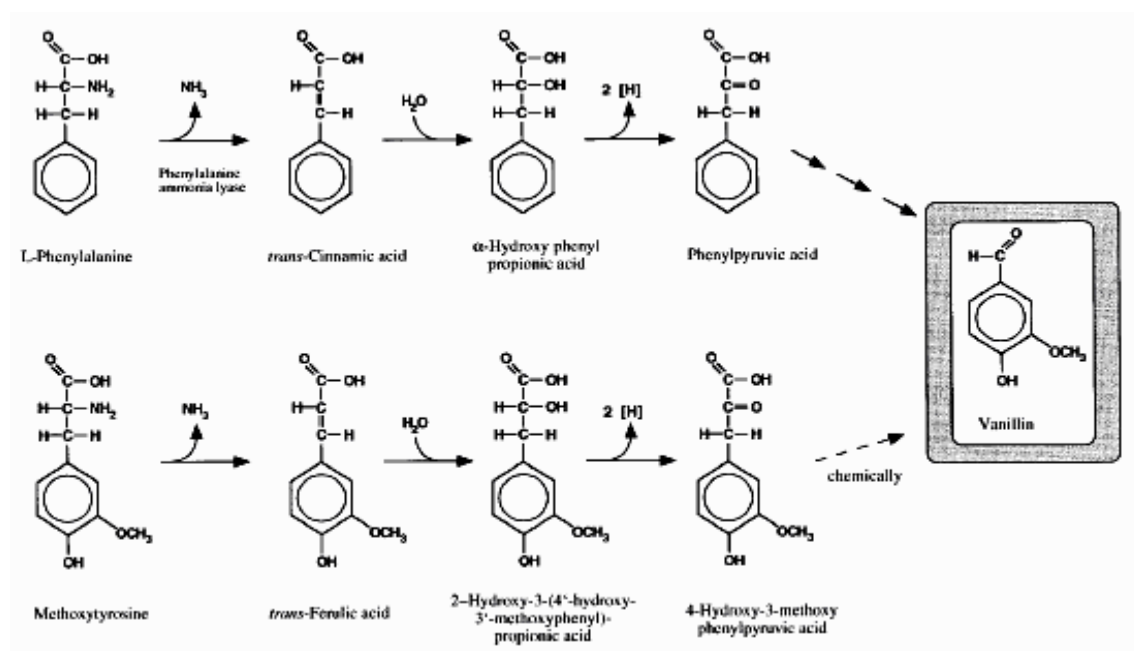
Figura 6: Biotrasformazione di stilbeni fenolici in vanillina catalizzata dall'enzima stilbene- α - β -diossigenasi di *P. paucimobilis* ceppo TMY 1009.



1.5.2 Biotrasformazione di aminoacidi aromatici

La fenilalanina è conosciuta come punto di partenza nelle piante per la biosintesi di flavonoidi, cumarine, stilbeni e lignina. Nella reazione chiave, catalizzata dalla fenilalanina-ammonio-liasi, la fenilalanina è deaminata ad acido *trans*-cinnamico. Nella biosintesi della lignina l'acido *trans*-cinnamico è convertito nei precursori della reazione di polimerizzazione quali alcol coniferilico e alcol sinapilico, via acido 4-idrossicinnamico, acido ferulico, acido 5-idrossiferulico, acido sinapico, aldeide coniferilica e aldeide sinapilica (Gross, 1977). Il metabolismo è stato anche studiato nei funghi *white-rot* che producono l'enzima fenilalanina-ammonio-liasi (Krings *et al.*, 1996) e in *Proteus vulgaris* CMCC2840 (Casey e Dobb, 1992), capace anche di deaminare la metossitirosina in acido fenilpiruvico, poi convertito in vanillina.

Figura 7: Biotrasformazione di aminoacidi aromatici a vanillina (Priefert *et al.*, 2001).



1.5.3 Biotrasformazione a partire da precursori fenilpropenoidi

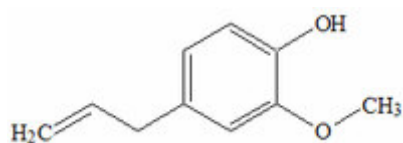
Un grande numero di microrganismi come batteri, funghi e lieviti sono stati impiegati per la produzione di vanillina a partire da precursori fenilpropanoidi come, l'eugenolo, l'isoeugenolo, l'acido ferulico, la vanilamina, gli alcoli coniferilico, vanillico e veratrilico etc.

La Tabella 3 mostra alcuni batteri lieviti e funghi che possono essere utilizzati per ottenere vanillina e acido vanillico a partire da vari precursori.

Tabella 3 Microrganismi coinvolti nella biotrasformazione di composti fenilpropanoici a molecole caratterizzanti l'aroma vaniglia.

Microrganismo	Substrato	Prodotto	Referenza
<i>Alcaligenes paradoxus</i>	Acido ferulico	Vanillina	Krishnamohan <i>et al.</i> , 1994
<i>Aspergillus niger</i>	Acido ferulico	Vanillina	Lesage-Meessen <i>et al.</i> , 1996
<i>Brettanomyces anomalus</i>	Acido ferulico	Vanillina	Edlin <i>et al.</i> , 1995
<i>Fomes fomentarius</i>	Acido ferulico	Vanillina	Ishikawa <i>et al.</i> , 1963
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Acido ferulico	Vanillina	Usha Tripathi <i>et al.</i> , 1999
<i>Nocardia</i> spp	Acido vanillico	Vanillina	Li e Rosazza, 2000
<i>Polyporus versicolor</i>	Acido ferulico	Vanillina	Rosazza <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Acido ferulico	Vanillato	Civolani <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Acido ferulico	Vanillina	Gasson <i>et al.</i> , 1998
<i>Spirulina platensis</i>	Acido ferulico	Vanillina	Ramachandra Rao <i>et al.</i> , 1996
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Eugenolo	Vanillina	Tadasa e Kayahara, 1983
<i>Pseudomonas</i> spp	Eugenolo	Vanillina	Overhage, 1999a
<i>Serratia</i> spp	Eugenolo	Vanillina	Rabenhorst, 1991
<i>Arthobacter globiformis</i>	Isoeugenolo	Vanillina	Cooper, 1987
<i>Serratia marcescens</i>	Vanillina	Vanillato	Prestelo <i>et al.</i> , 1989
<i>Streptomyces viridisporum</i>	Vanillina	Vanillato	Pometto e Crawford, 1983
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Alcol vanillico	Vanillina	Fraajie <i>et al.</i> , 1997
<i>Aspergillus niger</i>	Vanillilammia	Vanillina	Yoshida <i>et al.</i> , 1997
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>m</i> -metossitirosina	Vanillina	Casey e Dobb, 1992
<i>Brettanomyces anomalus</i>	Acido caffeico	Vanillina	Edlin <i>et al.</i> , 1995
<i>Brettanomyces anomalus</i>	Acido <i>p</i> -cumarico	Vanillina	Edlin <i>et al.</i> , 1995

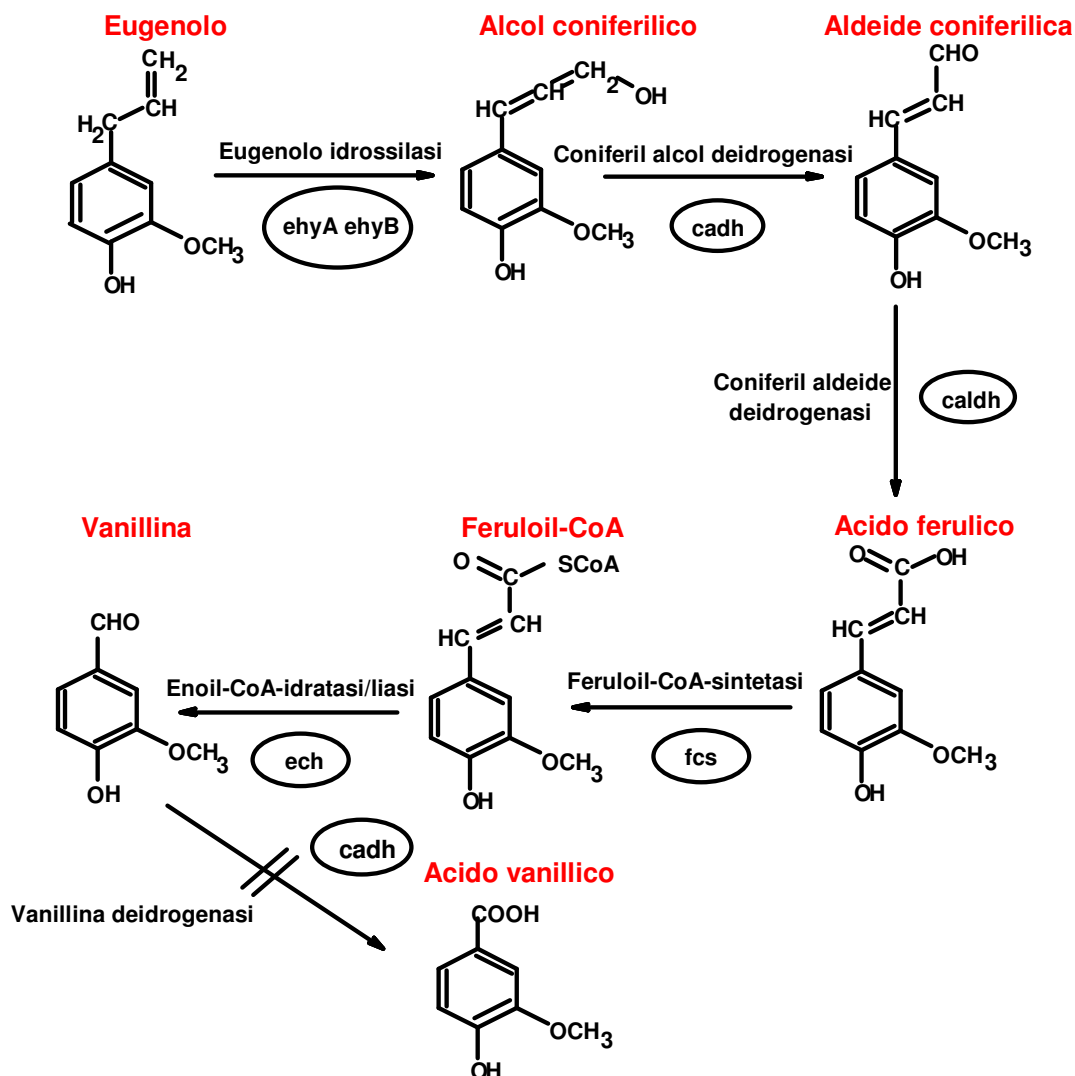
1.5.4 Biotrasformazione a partire da eugenolo ed isoeugenolo



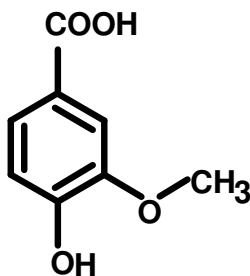
L'**eugenolo** ($C_{10}H_{12}O_2$) è un composto aromatico idrossilato, un guaiacolo con catena modificata poco solubile in acqua e solubile nei solventi organici. E' il principio attivo dell'olio essenziale di garofano cui conferisce il profumo caratteristico, e avendo un prezzo di mercato di 5 US\$ Kg⁻¹ rappresenta un substrato economico che può essere utilizzato per processi di biotrasformazione. In *Corynebacterium* sp. è degradato via acido ferulico a vanillina, acido vanillico e acido protocatetico, fino all'apertura dell'anello aromatico. In *Pseudomonas* sp. il primo *step* del suo catabolismo è la formazione dell'eossido di eugenolo catalizzato da una eugenolo idrossilasi codificata dai geni *ehyA* e *ehyB*; alcol e aldeide coniferilica sono i seguenti intermedi prima della conversione ad acido ferulico ed infine a vanillina (Figura 8). Mutanti del ceppo HR199 di *Pseudomonas* sp., incapaci di ossidare la vanillina ad acido vanillico inseguito all'inattivazione del gene *vdh* (che codifica per l'enzima vanillina deidrogenasi), sono in grado di produrre 2,9 mM (0,44 g L⁻¹) di vanillina a partire da 6,5 mM di eugenolo (Overhage *et al.*, 1999b). Tuttavia la vanillina prodotta non viene accumulata in quanto rapidamente ossidata da una deidrogenasi aspecifica (coniferil aldeide deidrogenasi). Nel 1993 Washisu *et al.* hanno brevettato un metodo per la produzione di vanillina da eugenolo, impiegando *Pseudomonas* sp. TK 2102 che è in grado di accumulare vanillina fino a 0,28 g L⁻¹ e di produrre altri metaboliti quali alcol coniferilico, aldeide coniferilica, acido ferulico e alcol vanillico. Da *P. fluorescens* E118 è stata isolata una eugenolo deidrogenasi che converte l'eugenolo ad alcol coniferilico; la sequenza aminoterminale di questo enzima ha elevata omologia con la corrispondente sequenza della eugenolo idrossilasi di *P. fluorescens* HR119 (Priefert *et al.*, 1999). La prima biotrasformazione dell'isoeugenolo in vanillina è stata ottenuta con *Aspergillus niger* ATCC 9142, tuttavia la successiva degradazione della vanillina ad alcol ed acido vanillico abbassa notevolmente l'efficienza di trasformazione, che è solo del 10% (Abraham *et al.*, 1988). Ceppi di *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* sono stati impiegati per trasformare eugenolo in vanillina. Con il ceppo di *Serratia marcescens* DSM 30126, utilizzando isoeugenolo come substrato di partenza, è stata ottenuta una resa del 20% ed una quantità di

3,8 g L⁻¹ di aroma dopo 9 giorni (Rabenhorst, 1991). Con *Rhodococcus rhodochrous* l'isoeugenolo viene convertito a vanillina con una resa molare del 58% (Chatterjee *et al.*, 1999). Negli ultimi anni è stato isolato dal suolo un ceppo di *Bacillus subtilis* che converte l'isoeugenolo in vanillina con una resa molare del 12,4%, circa 0,61 g L⁻¹ (Shimoni *et al.*, 2000). Tuttavia, utilizzando estratti cellulari si ottiene un incremento sia delle rese di bioconversione che della concentrazione di vanillina, che arriva a 0,9 g L⁻¹ ed una resa molare del 14%. La bioconversione dell'isoeugenolo in vanillina è stata ottenuta utilizzando anche colture cellulari di *Capsicum frutescens*, anche se utilizzando colture cellulari vegetali le rese appaiono sensibilmente più basse rispetto a quelle ottenute con biocatalizzatori microbici (Ramachandra Rao e Ravishankar 1999). Recentemente è stato isolato un nuovo ceppo di *Pseudomonas chlororaphis* in grado di bioconvertire in 24 ore 10 g L⁻¹ di isoeugenolo in 1,2 g L⁻¹ di vanillina (Kasana *et al.*, 2007). Nel 2007, Yamada *et al.* hanno clonato nel ceppo di *E. coli* BL21, il gene che codifica per la isoeugenolo monoossigenasi di *Pseudomonas putida* IE27, ottenendo 28,3 g L⁻¹ di vanillina a partire da 230 mM di isoeugenolo.

Figura 8: Sintesi di vanillina da eugenolo mediante il ceppo *Pseudomonas* sp. HR199 ingegnerizzato.



1.5.5 Biotrasformazione a partire da acido vanillico

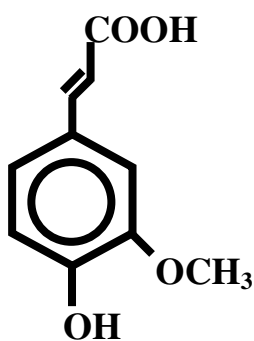


L'**acido vanillico** è il principale intermedio della degradazione dell'acido ferulico e della lignina e a differenza della vanillina può essere accumulato, nel tampone di bioconversione, ad elevate concentrazioni senza influire negativamente sull'efficienza del biocatalizzatore (Eggeling e Sahn 1980; Andreoni *et al.*, 1995). Utilizzando come biocatalizzatore il ceppo di *Pseudomonas*

fluorescens BF13 e come substrato acido ferulico è stata ottenuta dopo 5 ore di bioconversione una resa in acido vanillico pari al 95% del teorico con una concentrazione di prodotto pari a 6 g L^{-1} (Barghini *et al.*, 1998). Per incrementare la resa in acido vanillico e impedire una successiva degradazione il ceppo di *P. fluorescens* BF13 è stato sottoposto a mutagenesi mediante inserzione di un trasposone nel gene *vanA* che codifica per la subunità α dell'enzima vanillato-*O*-demetilasi rendendo il mutante incapace di crescere su terreno contenente acido ferulico come unica fonte di carbonio. Questo mutante è stato utilizzato per produrre acido vanillico a partire da acido ferulico con una resa oraria di 0,23 g di prodotto per g (peso secco) di biomassa (Civolani *et al.*, 2000). Le tappe della degradazione dell'acido vanillico sono state ben studiate in *Sporotrichum pulverulentum* (Ander *et al.*, 1980, 1983; Buswell *et al.*, 1982) e *Pycnoporus cinnabarinus* (Falconnier *et al.*, 1994). L'acido vanillico è decarbossilato a metossiidrochinone o ridotto a vanillina e alcol vanillico. Il principale problema che deriva dall'uso di *P. cinnabarinus* per la produzione di vanillina a partire da acido vanillico dipende dal fatto che in questo microrganismo le reazioni di decarbossilazione sono predominanti su quelle riduttive abbassando drasticamente la concentrazione di vanillina prodotta (Lesage-Meessen *et al.*, 1996). Questo problema è stato risolto aggiungendo nel tampone di bioconversione cellobiosio che spinge il microrganismo ad utilizzare vie cataboliche dell'acido vanillico di tipo riduttivo, consentendo di ottenere una resa molare del 51,7% pari a $0,56 \text{ g L}^{-1}$ di vanillina (Lesage-Meessen *et al.*, 1997; Bonnin *et al.*, 1999). L'aggiunta di cellobiosio induce la sintesi dell'enzima cellobiosio chinone ossidoreduttasi che probabilmente inibisce la decarbossilazione dell'acido vanillico catalizzata da una laccasi o una perossidasi (Ander *et al.*, 1990), limitando in questo modo la formazione del metossiidrochinone, favorendo l'accumulo di vanillina. La resa in vanillina è stata successivamente incrementata utilizzando sospensioni cellulari ad alta densità (Oddou *et al.*, 1999). L'utilizzo di resine a scambio ionico come la XAD-2, che adsorbe selettivamente la vanillina riducendo la sua concentrazione nel tampone di bioconversione ha consentito di incrementare le rese in vanillina fino a $1,58 \text{ g L}^{-1}$ (Lesage-Meessen *et al.*, 1996). Negli ultimi anni è stata valutata la possibilità di utilizzare il ceppo di *Nocardia* sp. NRRL 5646 per la conversione dell'acido vanillico in vanillina e l'enzima che catalizza questa conversione è stato purificato (Li e Rosazza 2000). In esperimenti condotti con cellule in crescita di questo ceppo l'acido vanillico è completamente consumato in 48 ore, producendo guaiacolo (69%) ed alcol vanillico (11%), mentre la vanillina è

presente nel terreno di crescita solo in tracce. Utilizzando cellule non proliferanti del ceppo di *Nocardia* e acido 4-*O*-benzilvanillico come substrato, non avvengono reazioni di decarbossilazione. Utilizzando infine l'enzima acido vanillico reduttasi è stato possibile bioconvertire l'acido vanillico in vanillina senza generare sottoprodotti (Li e Rosazza, 2000). Tuttavia l'utilizzo di questa metodica su scala industriale è limitata dal fatto che l'enzima necessita di ATP e NADPH come cofattore.

1.6 Biotrasformazione a partire da acido ferulico



L'**acido ferulico**, indicato anche come acido 3-(4-idrossi-3-metossifenil)-2-propenoico, nelle forme *trans* (più abbondante) e *cis*, è uno dei composti fenilpropenoici più diffusi in natura. Prende il nome dalla pianta *Ferula foetida*, appartenente alla famiglia delle ombrellifere, dalla quale è stato isolato per la prima volta nel 1886. Nelle piante, dove la forma predominante è quella *trans* (Kelley *et al.*, 1976), viene sintetizzato a partire

dall'acido cinnamico (Gross, 1985), che a sua volta è derivato dall'acido scichimico (Dewick, 1989).

L'acido ferulico è un acido biprotico, le due dissociazioni producono rispettivamente l'anione carbossilato ed il fenolato; è molto stabile in solventi organici, mentre può decarbossilare in soluzione acquosa per dare il 4-vinilguaiacolo (Pyysalo *et al.*, 1977).

1.6.1 Diffusione in natura dell'acido ferulico

L'acido ferulico è un componente fondamentale del materiale lignino-cellulosico, si trova infatti nella componente legnosa degli steli, radici, foglie, semi, frutti (Hartley e Harris, 1981; Smith e Hartley, 1983; Herrmann, 1989; Graf, 1992).

E' presente principalmente nella parete primaria e secondaria che circondano le cellule vegetali, ma è abbondante anche nell'epidermide, nei vasi xilematici e nello sclerenchima.

Rappresenta circa 1% della polpa della barbabietola da zucchero (5-10 g/Kg di sostanza secca) e della crusca di frumento (4-7 g/Kg di sostanza secca) e più del 4% della crusca di mais (~30 g/Kg di sostanza secca).

Nei cereali si trova legato in posizione *O*-5 dei residui di arabinosio degli arabinoxylani (Ishii, 1997); mentre nella barbabietola da zucchero è legato alle pectine, 50-60% in posizione *O*-2 dei residui di arabinosio e 40-50% in posizione *O*-6 dei residui di galattosio (Colquhoun *et al.*, 1994; Micard *et al.*, 1997).

E' stato osservato che nell'orzo un residuo ogni 31 di arabinosio è esterificato con acido *p*-cumarico, mentre uno ogni 15 è contratto con acido ferulico attraverso un legame estere (Muller-Havey *et al.*, 1986).

La quantità di acido ferulico così come quella di altri idrossicinnamati legati alla parete cellulare del frumento varia durante il processo di maturazione (Lam *et al.*, 1992). La sua concentrazione aumenta notevolmente durante la crescita per poi rimanere costante una volta terminato il processo di maturazione.

Una frazione di acido ferulico è presente all'interno della parete cellulare in forma dimerica (Eraso e Hartley, 1990; Iiyama *et al.*, 1994), che giocano un ruolo importante nelle interazioni tra i polisaccaridi che compongono la parete cellulare (Iiyama *et al.*, 1994) o tra i polisaccaridi e la lignina (Ralph *et al.*, 1995).

L'acido ferulico contenuto in queste matrici può essere liberato attraverso un trattamento con alcali (Antrim e Harris, 1977; Akin *et al.*, 1992).

Per la produzione di composti "naturali" l'acido ferulico in forma libera si può ottenere solo per mezzo di trattamenti enzimatici o microbiologici.

L'utilizzo dell'enzima cinnamoil-esterasi di *Aspergillus niger* (FAEA) e di una xilanasi, di *Trichoderma viride* (Faulds *et al.*, 1995) determina il rilascio di circa il 100% dell'acido ferulico contenuto nella crusca di frumento. Un'altra cinnamoil-esterasi di *A. niger* (CinnAE) in combinazione con una arabinasi e una α -L-arabinofuranosidasi rilascia acido ferulico legato ad arabinosio a partire da polpe di barbabietola da zucchero (Kroon *et al.*, 1996).

Anche alcuni ceppi di *Pseudomonas* producono delle cinnamoil-esterasi che agendo sulla crusca di frumento liberano monomeri e dimeri di acido ferulico (Kroon *et al.*, 1999; Blum *et al.*, 2000; Donaghy *et al.*, 2000).

1.6.2 Degradazione microbica dell'acido ferulico

La capacità di degradare l'acido ferulico, utilizzandolo come fonte di carbonio o di bioconvertire questa molecola in prodotti aromatici-sostituiti, è una caratteristica comune di molti microrganismi come batteri aerobi ed anaerobi, lieviti e funghi.

Tra i batteri sono stati descritti ceppi microbici appartenenti al genere *Bacillus*, enterobatteri, batteri aerobi caratteristici del rumine, attinomiceti come *Nocardia* e *Streptomyces*, e soprattutto microrganismi appartenenti al genere *Pseudomonas*, caratterizzati da una versatilità che li rende capaci di utilizzare vari composti aromatici, mono e poli sostituiti come fonti di carbonio. Tra i microrganismi eucarioti capaci di bioconvertire l'acido ferulico vanno menzionati i lieviti *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhodotorula rubra*, funghi filamentosi appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium* e basidiomiceti dotati di proprietà ligninolitiche.

Sulla base delle differenti tappe cataboliche sono state individuate quattro differenti vie per la degradazione dell'acido ferulico:

- A. decarbossilazione non ossidativa;
- B. riduzione della catena laterale ad acido diidroferulico;
- C. deacetilazione coenzima-A- indipendente;
- D. deacetilazione coenzima-A-dipendente (via β - e non β -ossidativa).

A. Decarbossilazione non-ossidativa dell'acido ferulico

In molti funghi e lieviti (Nazareth e Mavinkuve 1986; Arfmann e Abraham 1989; Rahouti *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 1993, 1994) ed in alcuni batteri (Andreoni *et al.*, 1984; Arfmann e Abraham 1989; Lauda *et al.*, 1992, 1993; Hashikado *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1993; Degrassi *et al.*, 1995; Karmakar *et al.*, 2000) la prima reazione del catabolismo dell'acido ferulico è catalizzata da una decarbossilasi con formazione di 4-vinilguaiacolo (o 4-idrossi-3-metossistirene).

Alcune decarbossilasi, che riconoscono come substrato non solo l'acido ferulico ma anche altre molecole ad esso strettamente correlate, sono state caratterizzate in numerosi microrganismi tra i quali: *Bacillus pumilus* UI-670 (formalmente *Pseudomonas fluorescens* UI-670) (Huang *et al.*, 1994), *B. pumilus* PS213 (Degrassi *et*

al., 1995), *Lactobacillus plantarum* (Cavin *et al.*, 1997a), *Bacillus subtilis* (Cavin *et al.*, 1998), *Streptomyces* sp. D7 (Chow *et al.*, 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (Goodey e Tubb 1982), and *Brettanomyces anomalus* (Edlin *et al.*, 1998). Inoltre I geni che codificano per le decarbossilasi di *S. cerevisiae* (Clausen *et al.*, 1994), *B. pumilus* (Zago *et al.*, 1995), *B. subtilis* (Cavin *et al.*, 1998), e *L. plantarum* (Cavin *et al.*, 1997b) sono stati clonati ed espressi in *Escherichia coli*. Il ceppo ricombinante realizzato clonando i geni ottenuti da *B. pumilus* è stato impiegato per sviluppare un processo di bioconversione bifasico tampone/esano che consente di ottenere una produzione di 9,6 g L⁻¹ di 4-vinilguaiacolo a partire da 25 g L⁻¹ di acido ferulico, con una resa molare del 49,7% (Lee *et al.*, 1998).

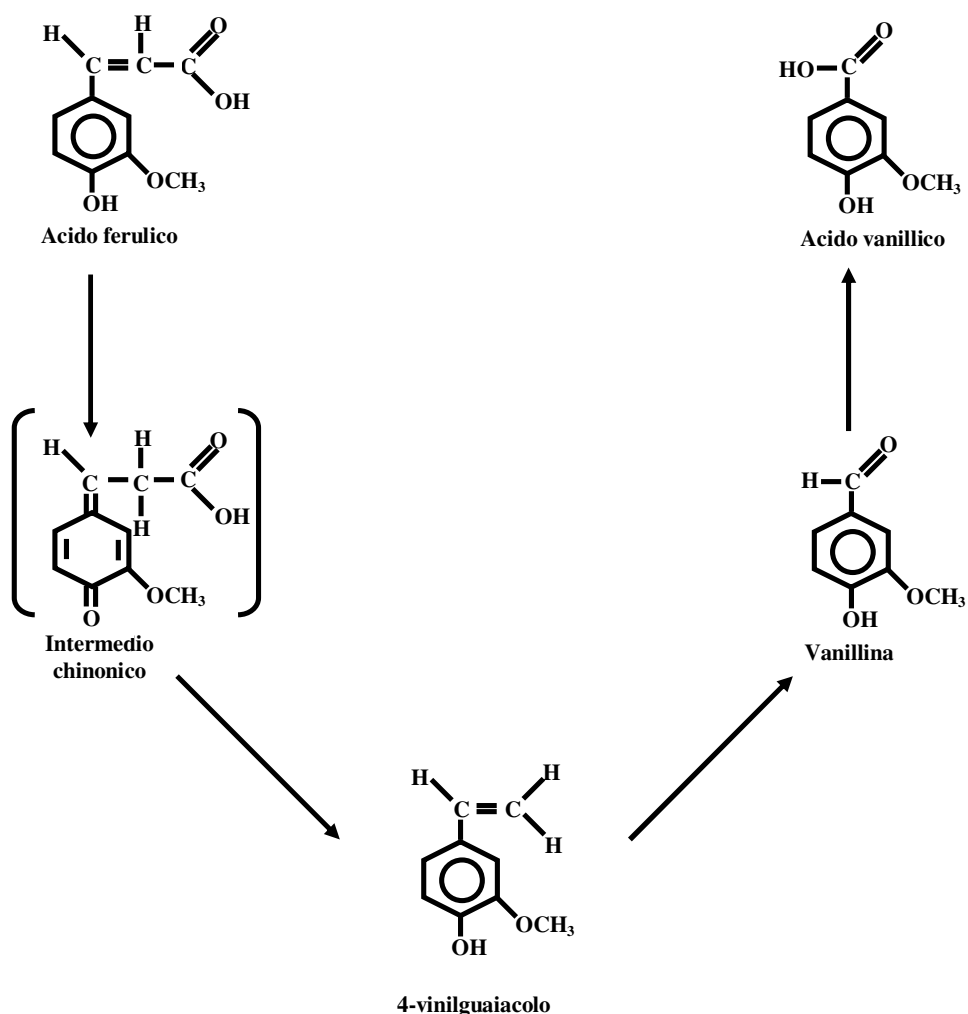
Il meccanismo proposto per la decarbossilazione dell'acido ferulico prevede l'isomerizzazione iniziale del substrato per opera di una fenolo decarbossilasi con formazione di un intermedio chinonico che poi è decarbossilato spontaneamente a 4-vinilguaiacolo (Huang *et al.*, 1993), come mostrato in Figura 9.

Il 4-vinilguaiacolo è successivamente convertito in aldeide vanillica ed acido vanillico. Questo meccanismo è in accordo con i dati sperimentali che indicano come indispensabile la presenza del gruppo idrossilico in posizione *para* sulla molecola di substrato. In alcuni microrganismi come *Pseudomonas cepacia* e *S. cerevisiae*, che adottano questo tipo di degradazione, è stato osservato che prima della formazione del 4-vinilguaiacolo, il substrato è trasformato in acido diidroferulico (Andreoni *et al.*, 1984; Huang *et al.*, 1993).

In *Corynebacterium glutamicum* acido diidroferulico, vanillina e acido vanillico sono stati identificati come metaboliti addizionali alla via catabolica principale (Lauda *et al.*, 1992, 1993). *Pseudomonas* sp. TMY1009 produce acido vanillico ed acido protocatetico dopo aver trasformato l'acido ferulico nell'intermedio 4-vinilguaiacolo (Samejima *et al.*, 1987). In *Fusariumj solani* (Nazareth e Mavinkuve 1986) e in *Bacillus coagulans* (Karmakar *et al.*, 2000) il 4-vinilguaiacolo è successivamente metabolizzato a vanillina, acido vanillico ed acido protocatetico. In *Polyporus versicolor* (Rahouti *et al.*, 1989) vanillina, alcol vanillico, acido vanillico, guaiacolo e catecolo sono stati osservati durante la degradazione dell'acido ferulico in aggiunta al 4-vinilguaiacolo; ed in *Paecilomyces variotii* e *Pestalotia palmarum* oltre agli intermedi appena citati, si osserva l'accumulo di metossi-idrochinone nel tampone di bioconversione, questa molecola potrebbe tuttavia rappresentare un prodotto di ossidazione dell'acido vanillico (Rahouti *et al.*, 1989). Numerose ricerche hanno

permesso di raggiungere una conoscenza approfondita dei meccanismi di reazione che portano alla decarbossilazione o alla riduzione dell'acido ferulico, mentre meno note sono le reazioni che portano alla formazione di alcol, aldeide ed acido vanillico a partire da 4-vinilguaiacolo. La successiva trasformazione del 4-vinilguaiacolo è stato studiato utilizzando cellule non proliferanti di *Nocardia* sp. in atmosfera arricchita di argon, poiché in queste condizioni si osserva la formazione di 4-etil-2-metossifenolo e 1-(4'-idrossi-3'-metossifenil)-etanone (Rosazza *et al.*, 1995). Anche questa reazione prevede la formazione di un intermedio chinonico, tuttavia non sono state osservate ulteriori trasformazioni a carico dei prodotti.

Figura 9: Decarbossilazione non ossidativa dell'acido ferulico con formazione di 4-vinilguaiacolo.



B. Riduzione della catena laterale dell'acido ferulico

E' una via tipica della degradazione anaerobica dell'acido ferulico, ed è stata osservata in *Pseudomonas cepacia* (Androni *et al.*, 1984), *Wolinella succinogenes* (Ohmiya *et al.*, 1986), *Saccharomyces cerevisiae* coltivato in atmosfera di argon (Huang *et al.*, 1993) e batteri lattici come *Lactobacillus plantarum* (Barthelmebs *et al.*, 2000).

In *Phanerochaete chrysosporium* (Enoki *et al.*, 1981; Gupta *et al.*, 1981) e in *Pseudomonas fluorescens* Fe2 (Andreoni e Bestetti 1988), tale reazione può avvenire anche in condizioni aerobie.

In questa via la catena laterale dell'acido ferulico è ridotta e si forma acido 4-idrossi-3-metossifenilpropionico (acido diidroferulico).

Il meccanismo proposto per la riduzione della catena laterale è analogo a quello implicato nella decarbossilazione non-ossidativa dell'acido ferulico a 4-vinil-guaiacolo, solo che in questo caso l'intermedio chinonico è ridotto (Rosazza *et al.*, 1995).

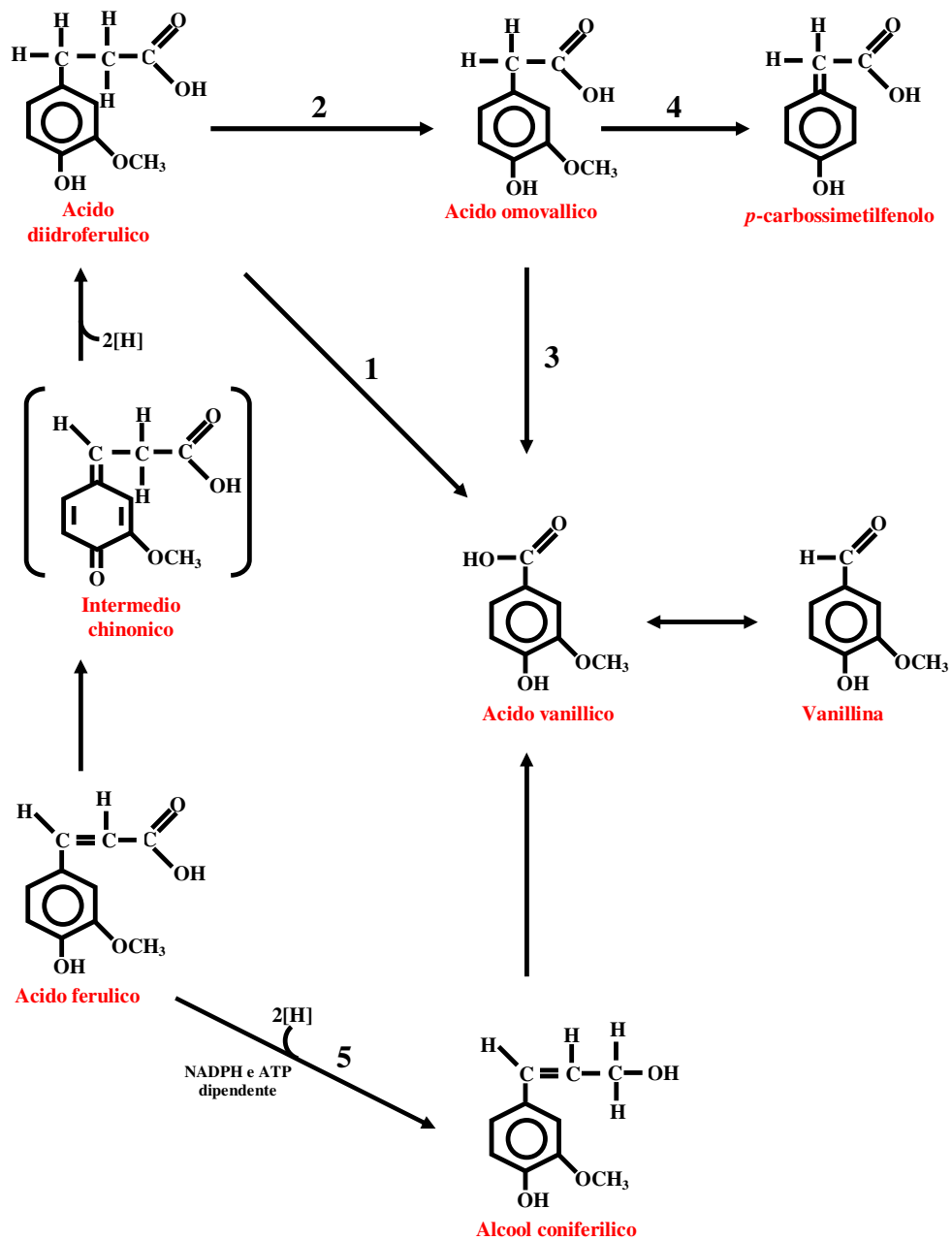
Nei microrganismi che sono anche capaci di decarbossilare l'acido ferulico, la via riduttiva è soppressa se sono presenti accettori d'idrogeno come nitriti, fumarati o ossigeno.

In *W. succinogenes* l'acido diidroferulico può essere direttamente convertito ad acido vanillico (Figura 10 reazione 1), oppure essere convertito ad acido omovallico (Figura 10 reazione 2), che a sua volta è trasformato in acido vanillico (Figura 10 reazione 3) o *p*-carbossimetilfenolo (Figura 10 reazione 4) (Ohmiya *et al.*, 1986).

In *P. fluorescens* il metabolismo procede attraverso la formazione di acido vanillico e protocatechico (Andreoni e Bestetti, 1988).

La degradazione riduttiva dell'acido ferulico nei funghi filamentosi, *Trametes* sp. (Nishida e Fukuzumi, 1978), *Sporotrichum pulverulentum* (Gupta *et al.*, 1981) e *Pycnoporus cinnabarinus* (Falconnier *et al.*, 1994), procede via formazione di alcol coniferilico (Figura 10 reazione 5), che a sua volta è convertito ad acido vanillico e vanillina. In *Enterobacter cloacae* (Grbic-Galic 1985; Grbic-Galic e La Pat-Polasko, 1985) l'acido ferulico è *O*-demetilato ad acido caffeico il quale è deidrossilato ad acido cinnamico che origina il fenilpropionato per riduzione della catena laterale.

Figura 10: Riduzione dell'acido ferulico ad acido diidroferulico.



C. Deacetilazione dell'acido ferulico CoA indipendente

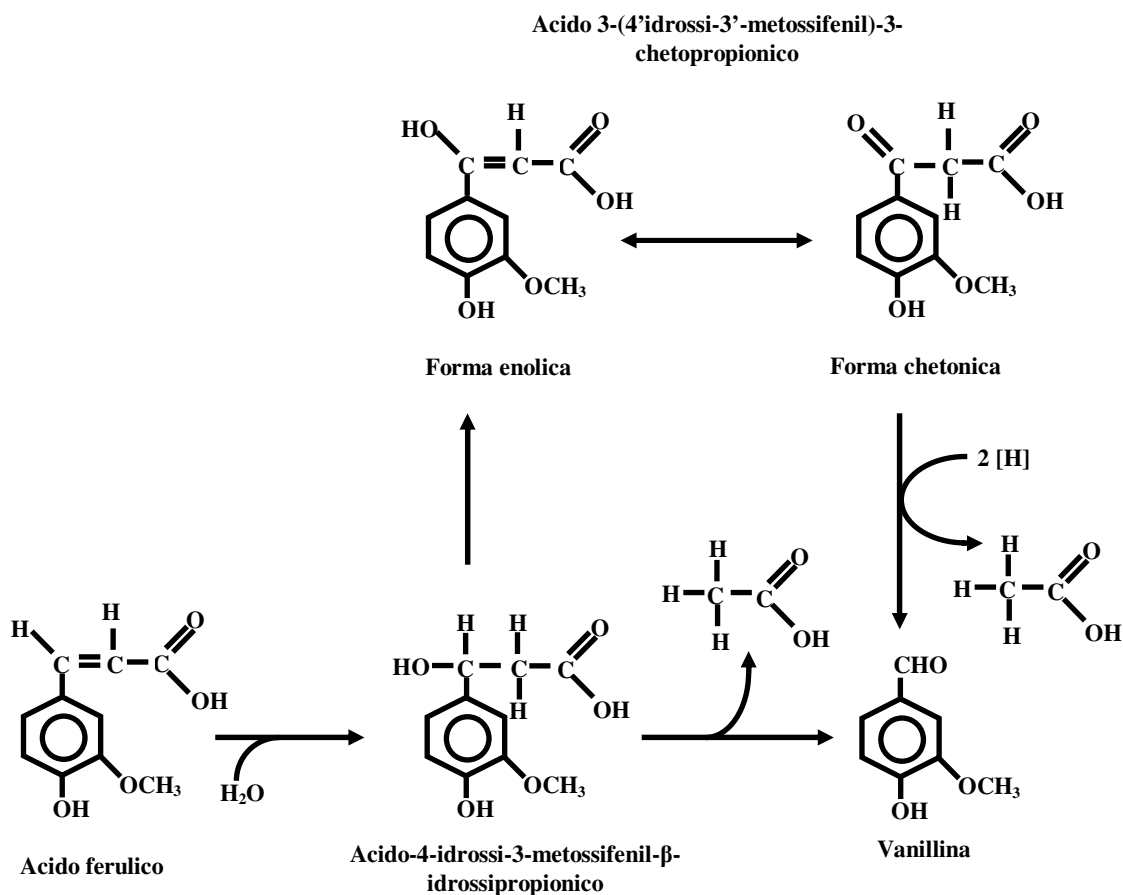
Un altro pathway di degradazione dell'acido ferulico diffuso in molti microrganismi procede per eliminazione dalla sua catena laterale di un gruppo acetato; questo meccanismo che porta alla formazione di vanillina, è utilizzato ad esempio da *Bacillus subtilis* (Gurujeyalakshmi e Mahadevan, 1987), *Pseudomonas mira* (Jurkovà e Wurst

1993), *Corynebacterium glutamicum* (Labuda *et al.*, 1992, 1993), *Streptomyces setonii* (Sutherland *et al.*, 1983), *Aspergillus* sp. (Labuda *et al.*, 1992, 1993).

La tappa seguente consiste nell'idratazione del doppio legame alifatico con la formazione di acido 4-idrossi-3-metossifenil-β-propionico come intermedio transiente, seguita dalla rimozione di un acetato e conseguente produzione di vanillina (Toms e Wood, 1970).

Un ulteriore meccanismo degradativo strettamente correlato a quello appena citato è stato proposto anche per spiegare l'accorciamento della catena laterale che avviene in *Pseudomonas* sp. quando è impiegato acido cinnamico come substrato (Hilton e Cain, 1990) o acido ferulico (Jurkova e Wurst, 1993), con la differenza che il derivato ottenuto dall'acido ferulico (fenil-β-idrossipropioico) è immediatamente ossidato con formazione di acido fenil-β-chetopropionico, che viene in seguito deacetilato formando benzaldeide o vanillina a seconda del substrato di partenza utilizzato (Figura 11).

Figura 11: Deacetilazione CoA-indipendente dell'acido ferulico.



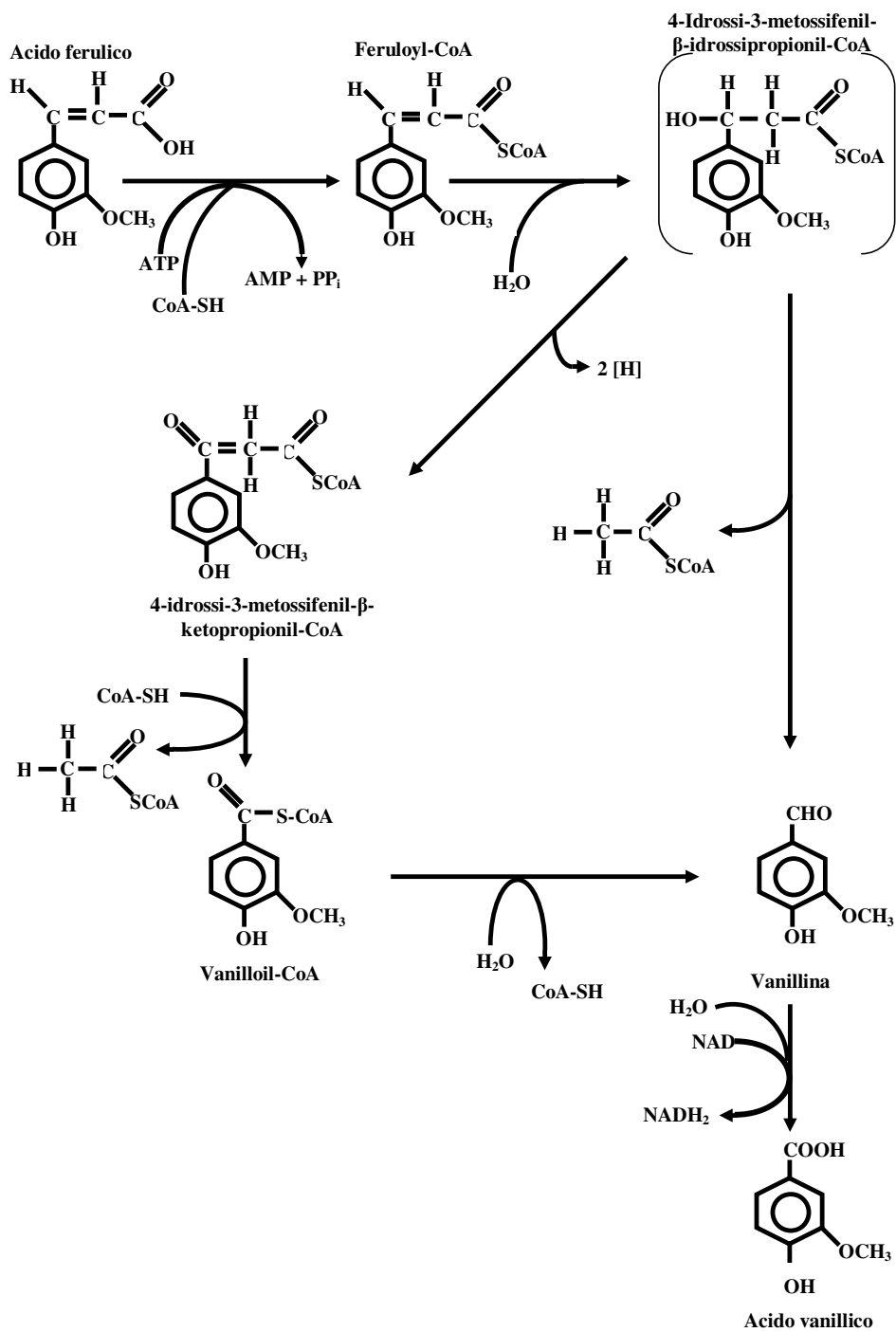
D. Deacetilazione dell'acido ferulico CoA dipendente

Un meccanismo di deacetilazione dipendente dal coenzima A analogo alla β -ossidazione degli acidi grassi è stato proposto per la degradazione di acidi cinnamici sostituiti in *Pseudomonas putida* (Zenk *et al.*, 1980) e dell'acido ferulico in *Rhodotorula rubra* (Huang *et al.*, 1994). Questa via prevede la formazione di 4-idrossi-3-metossifenil- β -chetopropionil-CoA come intermedio che viene successivamente convertito a vanillil-CoA ad opera dell'enzima β -chetotiolasi.

Solo in seguito è stata identificata in *Pseudomonas fluorescens* AN103 (Gasson *et al.*, 1998; Narbad e Gasson 1998) ed in *Pseudomonas* sp. HR199 (Overhage *et al.*, 1999a) una nuova via per la degradazione dell'acido ferulico CoA dipendente di tipo non β -ossidativa. La via prevede l'attivazione dell'acido ferulico a feruloil-CoA (tioestere) ad opera dell'enzima feruloil-CoA sintetasi codificato dal gene *fcs*. Il feruloil-CoA è, successivamente, idratato e subisce una riduzione di tipo non β -ossidativo del numero degli atomi di carbonio della catena laterale, con formazione di vanillina e acetil-CoA, queste reazioni sono catalizzate da un solo enzima polifunzionale detto enoil-CoA idratasi-aldolasi (Figura 12). Questa funzione è stata confermata sia utilizzando preparazioni pure dell'enzima (Mitra *et al.*, 1999) che esprimendo in *Escherichia coli* i geni *fcs* e *ech* di *Pseudomonas* sp. HR199 (Overhage *et al.*, 1999a; Priefert *et al.*, 1997) e di *Pseudomonas fluorescens* AN103 coinvolti nella degradazione dell'acido ferulico. Il clonaggio dei geni *fcs* e *ech* da *Pseudomonas* sp. HR199 e la loro espressione in *E. coli*, conferisce infatti all'ospite la capacità di bioconvertire l'acido ferulico in vanillina con una velocità massima di conversione di 0,22 $\mu\text{mol/ml}$ minuto (Overhage *et al.*, 1999a).

Una via degradativa dell'acido ferulico CoA dipendente di tipo non β ossidativa è stata identificata anche in *Amycolatopsis* sp. HR167 (Achterholt *et al.*, 2000) e in *Delftia acidovorans* (Plaggenborg *et al.*, 2001).

Figura 12: Deacetilazione CoA-dipendente dell'acido ferulico (via β e non ossidativa).



1.7 Degradazione microbica della vanillina

Tutti i microrganismi che sono stati utilizzati come biocatalizzatori per la produzione di vanillina, ossidano rapidamente il prodotto ad acido vanillico, il quale successivamente viene demetilato ad acido protocatecico o decarbossilato a guaiacolo.

La notevole reattività della vanillina fa sì che eserciti effetti tossici nei confronti di molti microrganismi (Matamoros-Leon *et al.*, 1999; Zaldivar *et al.*, 1999), per questo raramente si accumula e viene generalmente convertita in prodotti meno tossici come alcol vanillico o acido vanillico (Andreoni *et al.*, 1995; Barghini *et al.*, 1998; Overhage *et al.*, 1999a). Molto spesso infatti la vanillina è un intermedio transitorio, in *B. subtilis* l'ossidazione della vanillina ad acido vanillico è catalizzata da una vanillina ossidasi che è stata identificata anche in *Streptomyces setonii* (Sutherland *et al.*, 1983). Cellule di *Streptomyces setonii* cresciute su acido ferulico degradano l'acido vanillico via acido protocatecuico mentre se le cellule sono state cresciute in terreno contenente vanillina l'acido vanillico è decarbossilato a guaiacolo, il quale viene successivamente metabolizzato a catecolo (Sutherland *et al.*, 1983). Il guaiacolo è un prodotto del catabolismo dell'acido vanillico anche in *Bacillus megaterium* (Crawford e Olson 1978) e *Nocardia* sp. (Li e Rosazza, 2000). Questo meccanismo di decarbossilazione è simile alla decarbossilazione dell'acido ferulico e prevede la formazione di un intermedio chinonico che viene spontaneamente decarbossilato (Huang *et al.*, 1994). I geni coinvolti nella decarbossilazione non ossidativa dell'acido vanillico sono stati clonati da *Streptomyces* sp. D7 e la loro funzione è stata confermata mediante espressione in *Streptomyces lividans* 1326 (Chow *et al.*, 1999).

1.8 *Escherichia coli*

Escherichia coli, il cui nome deriva dal suo scopritore Theodor Escherich, è un batterio gram negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. E' un coliforme dalla forma bastoncellare, aerobio anaerobio facoltativo che non forma spore, in grado di crescere usando fonti di carbonio semplici, incluso glucosio ed acetato, fermenta il lattosio ed è ossidasi-negativo.

E' normalmente presente nella microflora contenuta nel tratto intestinale dell'uomo ed in genere negli animali a sangue caldo dove partecipa alla digestione del cibo ed alla fabbricazione di numerose vitamine essenziali.

In genere *E. coli* riveste il ruolo di commensale, anche se alcuni ceppi sono l'agente eziologico di malattie intestinali ed extra-intestinali come infezioni del tratto urinario, meningite, peritonite e setticemia.

Grazie ad un'estesa varietà di geni metabolici e regolatori può facilmente colonizzare ambienti estremamente differenti quali il suolo, l'acqua, i sedimenti ed a volte anche il cibo. (Dougan *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2001).

Analisi filogenetiche hanno dimostrato che i ceppi di *E. coli* possono essere distinti in quattro gruppi: A, B1, B2 e D. (Herzer *et al.*, 1990; Selander *et al.*, 1987), i ceppi patogeni appartengono principalmente al gruppo B2 e D, mentre la maggior parte dei commensali appartiene al gruppo A (Bingen *et al.*, 1998; Boyd *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2000; Clermont *et al.*, 2000).

Le esperienze maturate in diversi laboratori utilizzando *E. coli* K12 ed i suoi derivati ha fatto sì che il National Institutes of Health Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules (NIH Guidelines, U.S. Department of Health and Human Services, 1986) abbia potuto classificare tali varianti microbiche come GRAS, (Generally Regarded As Safe) categoria che include microrganismi non patogeni per l'uomo, animali e vegetali. I ceppi di *E. coli* K12 sono infatti colonizzatori poco efficienti del tratto intestinale, anche quando è scarsa la competizione con altri colonizzatori. Derivati di questo ceppo sono stati utilizzati negli ultimi anni nella produzioni di composti, o per lo sviluppo di processi finalizzati alla produzione di farmaci, Tabella 4.

Tabella 4: Proteine prodotte impiegando ceppi di *E. coli* K12 ricombinanti (Hodgson, 1993).

Prodotto	Applicazione
Ormone bovino della crescita	Incremento nella produzione di latte
Cellulasi	Degradazione della cellulosa
Ormone umano della crescita	Cure delle anomalie della crescita causate da carenza di GH
Insulina umana	Cura del diabete
Tumor necrosis factor	Sviluppo di protocolli terapeutici per la cura di tumori
Fattore VIII di coagulazione	Cura dell'emofilia A
Fattore IX di coagulazione	Cura dell'emofilia B
Eritropoietina	Cura delle anemie

1.8.1 Utilizzo di *E. coli* per la produzione di sostanze impiegate in ambito alimentare

Secondo la normativa vigente solo i microrganismi definiti GRAS, come *E. coli*, possono essere utilizzati in ambito alimentare. Come tale le cellule e gli enzimi che vengono purificati a partire da questo microrganismo vengono largamente utilizzati per la produzione di molecole di interesse alimentare. L' L-triptofano, ad esempio, viene prodotto a partire da ceppi ricombinanti di *E. coli* e largamente sfruttato in ambito alimentare per la produzione dell'aminoacido fenilalanina. La via metabolica che porta alla sintesi di questo aminoacido è stata studiata per poter produrre composti aromatici dotati di un interesse industriale (Frost e Lieveese, 1994). I geni che codificano per gli enzimi che sono coinvolti nella biosintesi del triptofano sono stati utilizzati per costruire cassette geniche da far esprimere in ceppi di *E. coli* ottenendo in questo modo efficienti biocatalizzatori in grado di produrre elevate quantità di triptofano (Berry, 1996). La fenilalanina è un aminoacido molto importante e largamente utilizzato in campo alimentare in quanto viene utilizzato per la sintesi di aspartame, un dolcificante ipocalorico (Ager *et al.*, 1998).

Il D-tagatosio, un isomero del galattosio, è un'altra molecola di interesse alimentare ottenuta a partire da ceppi ricombinati di *E. coli*. E' un potente dolcificante con un gusto molto simile al saccarosio. Utilizzando un ceppo ricombinate di *E. coli* JM105 contenente il gene che codifica per l'L-arabinosio isomerasi è stato sviluppato un

efficiente processo di bioconversione del galattosio presente in substrati poco costosi in tagatosio (Roh *et al.*, 2000). Ceppi ricombinanti di *E. coli* sono stati anche utilizzati per la produzione di oligosaccaridi da inulina, simili come composizione a quelli ricavati dalla frutta (Yun *et al.*, 1999). Le miscele di oligosaccaridi vengono comunemente impiegate sia in Europa che in Asia per le loro proprietà benefiche sulla salute umana.

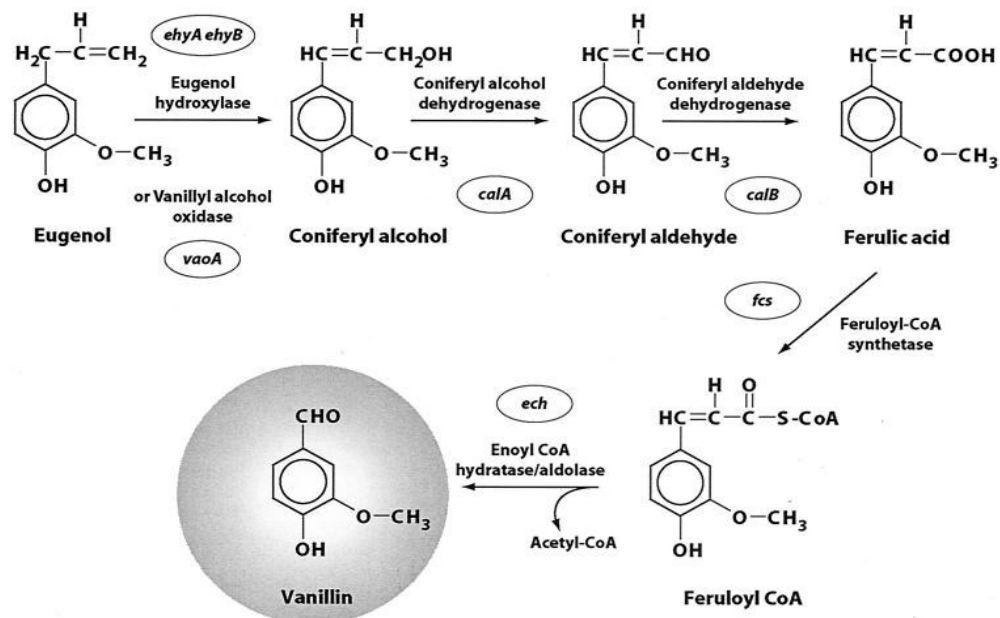
1.8.2 Bioconversione dell'acido ferulico in vanillina mediante ceppi ricombinanti di E. coli

Nel 2003 Overhage *et al.* hanno dimostrato che, trasferendo in *E. coli* i geni di *Pseudomonas fluorescens* HR199 responsabili della bioconversione dell'eugenolo in vanillina, è possibile conferire a questo microrganismo la capacità di produrre vanillina. Nel processo a due stadi proposto da questi autori era previsto l'impiego di due ceppi ricombinanti: il primo in grado bioconvertire l'eugenolo ad acido ferulico ed il secondo capace di convertire l'acido ferulico in vanillina (Figura 13).

Il primo ceppo ricombinante di *E. coli* XL-1 blue è stato realizzato clonando in un vettore plasmidico i geni di *P. fluorescens* HR199 (Overhage *et al.*, 1999a) che codificano per gli enzimi responsabili della conversione dell'eugenolo ad acido ferulico:

- l'eugenolo idrossilasi (*ehyA* e *enyB*) che converte l'eugenolo in alcol coniferilico;
- l'alcol coniferilico deidrogenasi (*calA*) che ossida l'alcol coniferilico in aldeide coniferilica;
- l'aldeide coniferilica deidrogenasi (*calB*) che converte l'aldeide coniferilica in acido ferulico (Figura 13).

Figura 13 Biotrasformazione dell' eugenolo in vanillina mediante ceppo ingegnerizzato (Overhage *et al.*, 2003).



Il ricombinante così ottenuto tuttavia non era in grado di bioconvertire l'eugenolo in acido ferulico anche coesprimendo nell'ospite il gene (*azu*) che codifica per l'accettore di elettroni della eugenolo idrossilasi in *Pseudomonas* OPS1 (Brandt *et al.*, 2001).

Il limite di questo sistema è stato superato sostituendo i geni che codificano per l'eugenolo idrossilasi con il gene *vaoA* di *Penicillium simplicissimum* che codifica per l'enzima vanillico deidrogenasi (De Jong *et al.*, 1992), il quale presenta delle ampie regioni di omologia con la struttura primaria dell'eugenolo idrossilasi di *Pseudomonas* HR199 (Fraaije *et al.*, 1995). Utilizzando questo ceppo ricombinante di *E. coli* sono stati ottenuti in 30 ore di bioconversione 14,7 g L⁻¹ di acido ferulico con una resa molare di prodotto del 93,3%.

Il secondo ceppo ricombinante è stato ottenuto clonando i geni di *Pseudomonas* HR199 che codificano per gli enzimi responsabili della conversione dell'acido ferulico in vanillina, e più precisamente:

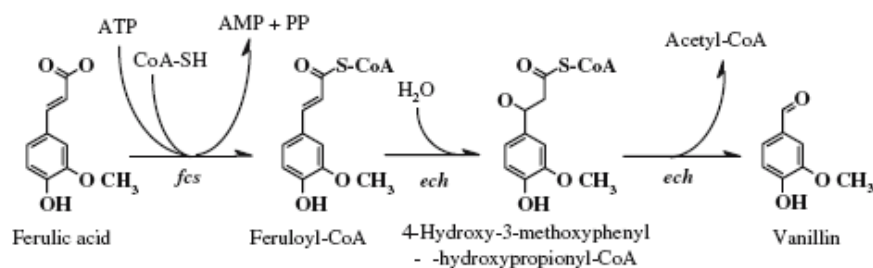
- il gene *fcs* che codifica per la feruloil CoA sintetasi, che converte l'acido ferulico il feruloil CoA;
- Il gene *ech* che codifica per la enoil CoA idratasi/aldolasi che converte il feruloil-CoA in vanillina.

In questo caso non solo la quantità di vanillina prodotta è bassa ($0,3 \text{ g L}^{-1}$), ma questa è rapidamente ridotta ad alcol vanillico (Overhage *et al.*, 1999b).

Nel 2005 Yoon *et al.* hanno sviluppato due ceppi ricombinanti di *E. coli* per la produzione di vanillina a partire da acido ferulico.

I biocatalizzatori sono stati ottenuti facendo esprimere in *E. coli* DH5 α i geni *fcs* (feruloyl-CoA sintetasi) ed *ech* (enoil-CoA idratasi/aldolasi) di *Amycolatopsis* sp. e *Delfia acidovorans* (Figura 14) sotto il controllo del promotore inducibile dell'arabinosio (P_{BAD}).

Figura 14: Biotrasformazione dell'acido ferulico in vanillina (Yoon *et al.*, 2005).



La più alta produttività di vanillina è stata ottenuta utilizzando cellule in crescita del ceppo ricombinante di *E. coli* che esprime i geni di *Amycolatopsis* sp., e dopo 48 ore di crescita e di bioconversione sono stati ottenuti $1,1 \text{ g L}^{-1}$ di vanillina a partire da 2 g L^{-1} di acido ferulico.

Come detto in precedenza il fattore che limita maggiormente la produzione di vanillina è la sua alta tossicità in risposta alla quale viene ossidata o ridotta in prodotti meno tossici.

Una possibile soluzione a questo problema sembra essere l'utilizzo di resine a scambio ionico, capaci di assorbire selettivamente la vanillina presente nel tampone di bioconversione, mano a mano che viene prodotta.

L'utilizzo della resina a scambio ionico DM11 ha consentito di ottenere con il ceppo *Streptomyces* sp. V-1, $19,2 \text{ g L}^{-1}$ di vanillina in 55 ore di bioconversione (Hua *et al.*, 2007).

In Yoon *et al.* (2007) l'incremento della produzione di vanillina è stato ottenuto mediante due strategie. Nella prima è stata selezionata una variante del ceppo ricombinante di *E. coli*, che esprime i geni coinvolti nella bioconversione di

Amycolatopsis sp. HR199, capace di tollerare concentrazioni elevate di vanillina. Nella seconda è stata aggiunta al tampone di bioconversione una resina a scambio ionico (XAD-2) che ha consentito di ottenere 2,9 g di vanillina a partire da 10 g L⁻¹ di acido ferulico.

In Barghini *et al.* (2007) il biocatalizzatore in grado di produrre vanillina a partire da acido ferulico è stato ottenuto esprimendo in *E. coli* JM109 i geni (*fcs* e *ech*) di *P. fluorescens* BF13 che codificano per gli enzimi coinvolti nella bioconversione.

Questi geni sono stati clonati in un vettore plasmidico sotto il controllo del promotore nativo di *P. fluorescens* BF13 (Pfer).

Utilizzando per la bioconversione cellule non proliferanti (*resting*), sono stati ottenuti 2,52 g L⁻¹ di vanillina.

Risultati riportati in letteratura hanno dimostrato che la produzione di vanillina mediante l'impiego di biocatalizzatori derivanti da *E. coli* è influenzata da numerosi parametri.

Converti *et al.* (2003) studiando la capacità, di diversi ceppi ricombinanti, ottenuti da ceppi di laboratorio di *E. coli* K12, di convertire l'acido ferulico in vanillina hanno osservato che, il ceppo di *E. coli* JM109 consente di ottenere la produttività specifica e volumetrica più elevata.

L'anno successivo Torre *et al.* (2004) hanno dimostrato che l'aggiunta al tampone di bioconversione di fattori nutrizionali, ed in particolare dell'estratto di lievito (0,005% w/v), consente di incrementare la quantità di vanillina prodotta. L'estratto di lievito è probabilmente usato come fonte di cofattori, come il CoA che sono fondamentali per sostenere la bioconversione.

Il parametro più importante per ottenere un efficiente biocatalizzatore sembra essere tuttavia la scelta del vettore plasmidico per veicolare in *E. coli* i geni che codificano per gli enzimi chiave.

Barghini *et al.* (2007) hanno dimostrato che l'utilizzo di plasmidi basso numero di copie è fondamentale per ottenere un buon biocatalizzatore, in quanto la sovra-espressione degli enzimi coinvolti nella degradazione dell'acido ferulico sembra avere un effetto tossico in cellule di *E. coli*.

Nello stesso lavoro emerge come l'uso per la bioconversione di cellule derivanti da colture cresciute a 30°C consente di incrementare la resa in vanillina.

In accordo con numerosi lavori riportati in letteratura l'utilizzo di una temperatura di crescita sub-ottimale in *E. coli* è un'ottima strategia per incrementare la produzione di

proteine ricombinanti (Sorensen *et al.*, 2005). Anche la temperatura di bioconversione influenza in modo significativo la resa in vanillina ed i risultati più interessanti sono stati ottenuti lavorando a 30°C (Barghini *et al.*, 2007).

Negli ultimi anni si sta valutando la possibilità di impiegare residui di lavorazioni agro-industriali per la produzione di composti di interesse commerciale, come soluzione per lo smaltimento e la loro valorizzazione. Gli acidi arilpropenoici, come l'acido ferulico, sono disponibili in grandi quantità come sottoprodotti dell'industria agroalimentare.

In Di Gioia *et al.* (2007) è stato sviluppato un processo enzimatico per il rilascio di acido ferulico a partire dalla crusca di frumento. L'acido ferulico è stato poi utilizzato come substrato per produrre vanillina impiegando un ceppo di *E. coli* che esprime i geni di *P. fluorescens* BF13 che codificano per gli enzimi coinvolti nella bioconversione. L'utilizzo dell'acido ferulico, derivante dall'idrolisi enzimatica della crusca di frumento, ha consentito di ottenere una resa molare in vanillina del 50%, che veniva tuttavia rapidamente ridotta ad alcol vanillico. La purificazione dell'idrolizzato con resine a scambio ionico e la rimozione della maggior parte dei carboidrati ha consentito di ottenere una elevata resa di bioconversione, (superiore al 70%) ed una riduzione della formazione di alcol vanillico.

1.9 *Pseudomonas*

Il termine *Pseudomonas* è stato utilizzato tradizionalmente per indicare un gruppo eterogeneo di batteri gram-negativi non enterici, motili per la presenza di flagelli polari, non fermentanti e generalmente aerobi.

I batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* sono caratterizzati dalla capacità di utilizzare come fonte di carbonio una vasta gamma di composti organici e di sintesi (Palleroni, 1992a). Questa ampia versatilità catabolica ha permesso loro di colonizzare tutti gli ambienti naturali: terrestre, marino e d'acqua dolce, a volte in associazione con animali e piante (Rahme, 1995).

Alcune specie sono patogene per le piante (De Vos *et al.*, 1985), altre sono patogeni opportunistici per gli animali e l'uomo (Palleroni, 1992b). Alcune specie promuovono la crescita delle piante e possono avere una funzione di protezione verso altri patogeni e

vengono, quindi, studiate come agenti per il controllo biologico (O'Sullivan e O'Gara, 1992).

1.9.1 P. fluorescens BF13: organizzazione dei geni responsabili del catabolismo dell'acido ferulico ed isolamento del mutante privo di vanillina deidrogenasi

Il ceppo BF13 è stato isolato, nel laboratorio di Chimica delle Fermentazioni dell'Università degli studi della Tuscia, a partire da campioni di terra boschiva, nell'ambito di un processo di screening di microrganismi capaci di utilizzare composti fenilpropenoici come unica fonte di carbonio.

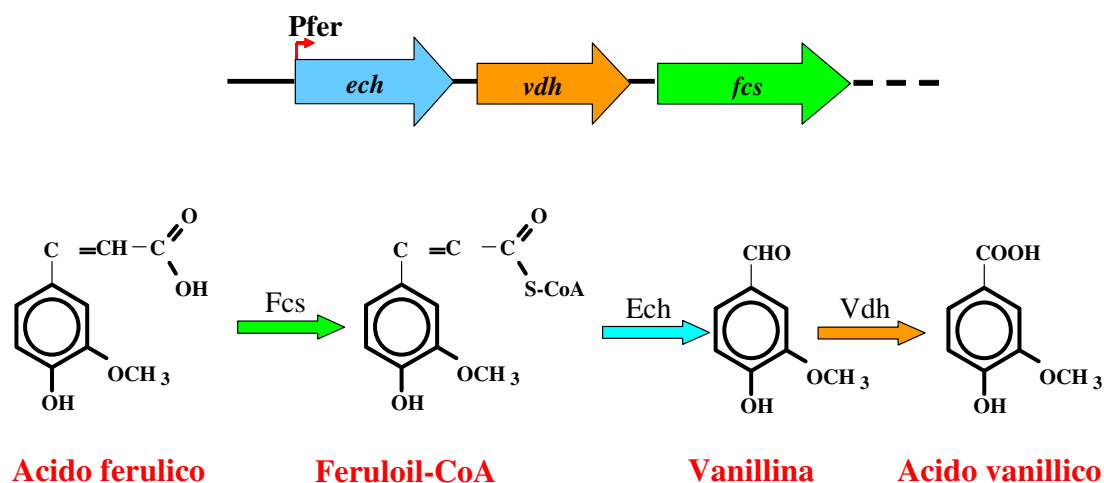
Sulla base delle proprietà fenotipiche il ceppo BF13 è stato identificato come *Pseudomonas fluorescens* (99,9% identità) (Ruzzi *et al.*, 1997).

Questo ceppo si è dimostrato anche capace di degradare altri composti fenilpropenoici strutturalmente correlati all'acido ferulico, quali l'acido *m*-cumarico (acido 3-idrossicinamico) e *p*-cumarico (acido 4-idrossicinamico) ed acidi benzoici sostituiti come l'acido 3-idrossibenzoico e 4-idrossibenzoico (Ruzzi *et al.*, 1997).

In *P. fluorescens* BF13, i geni che codificano per gli enzimi responsabili della conversione dell'acido ferulico in acido vanillico, sono localizzati, a livello cromosomale, in un *cluster* di circa 7.0 Kb e vengono trascritti a partire da un promotore unico (Pfer). Questi geni, la cui trascrizione avviene solo in presenza di acido ferulico, sono organizzati secondo la sequenza *ech*, *vhd*, *fcs*, come mostrato nella Figura 15.

Nelle prime due reazioni l'acido ferulico viene convertito in feruloil-CoA e vanillina dagli enzimi feruloil-CoA sintetasi, codificato dal gene *fcs* ed enoil-CoA idratasi/aldolasi, codificati dal gene *ech*. La vanillina viene ossidata ad acido vanillico dall'enzima vanillina deidrogenasi codificato dal gene *vdh*. (Figura 15).

Figura 15: Organizzazione dell'operone per il catabolismo dell'acido ferulico in *P. fluorescens* BF13.



Il mutante di BF13 incapace di ossidare la vanillina ad acido vanillico è stato ottenuto mediante mutagenesi sito-specifica, utilizzando un plasmide non replicativo, *pvdh::Km* (Figura 16), con spettro d'ospite ristretto. Il plasmide contiene una porzione del gene che codifica per l'enzima vanillina deidrogenasi (*vdh*), e l'integrazione sito-specifica nel corrispondente locus del cromosoma determina l'inattivazione funzionale di questo gene e quindi l'incapacità del ceppo di produrre vanillina deidrogenasi in forma attiva.

L'inserzione genera una duplicazione delle sequenze bersaglio, distrugge l'integrità dell'operone catabolico e determina, quindi, la perdita della capacità del ceppo di degradare l'acido ferulico (Figura 17).

Il mutante così ottenuto, denominato BF13-1p4, non è in grado di utilizzare l'acido ferulico come unica fonte di carbonio, e per effetto dell'integrazione non esprime il gene che codifica per la feruloil-CoA sintetasi. L'inserzione genica determina il blocco della trascrizione del gene (*fcs*) per la feruloil-CoA sintetasi rendendo il mutante incapace di convertire l'acido ferulico in feruloil-CoA, questa capacità è stata acquisita da BF13-1p4 inserendo nel ceppo un plasmide (pBB1, Figura 18, Torre *et al.*, 2004) che veicola il gene funzionale *fcs*. I trasformanti così ottenuti, BF13-1p4(pBB1) sono stati utilizzati, in questo lavoro di tesi, per valutare la capacità del ceppo di produrre vanillina a partire da acido ferulico.

Figura 16: Mappa del plasmide utilizzato per la mutagenesi sito specifica del gene *vdh*. L'inserzione delle sequenze plasmidiche distrugge l'integrità dell'operone catabolico per la degradazione dell'acido ferulico.

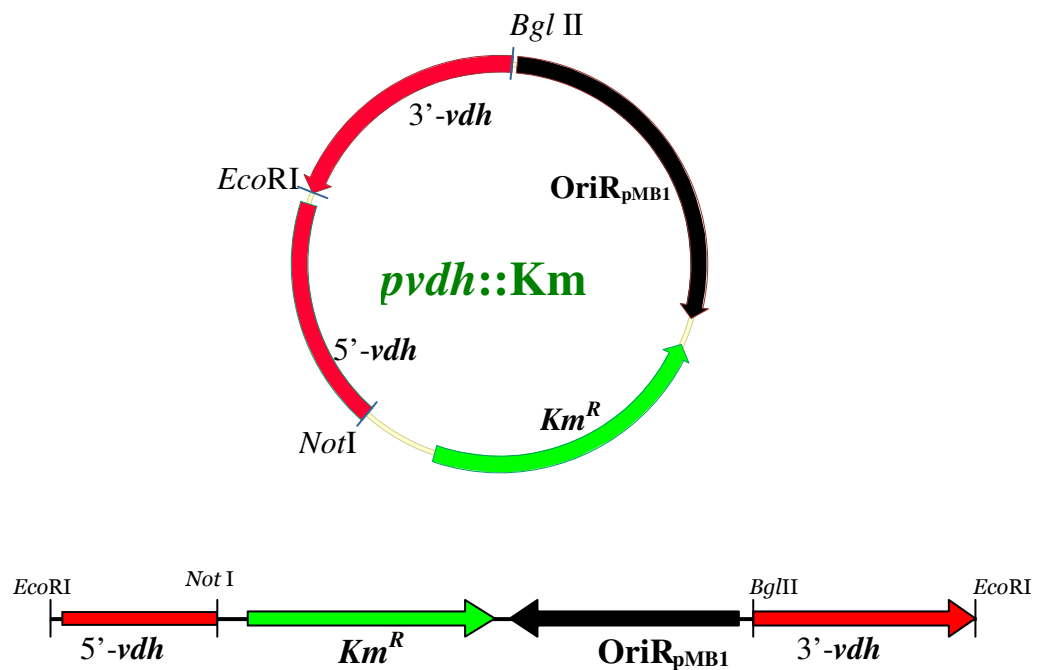


Figura 17: Meccanismo di ricombinazione omologa per l'ottenimento del mutante di BF13 con il gene *vdh* inattivo.

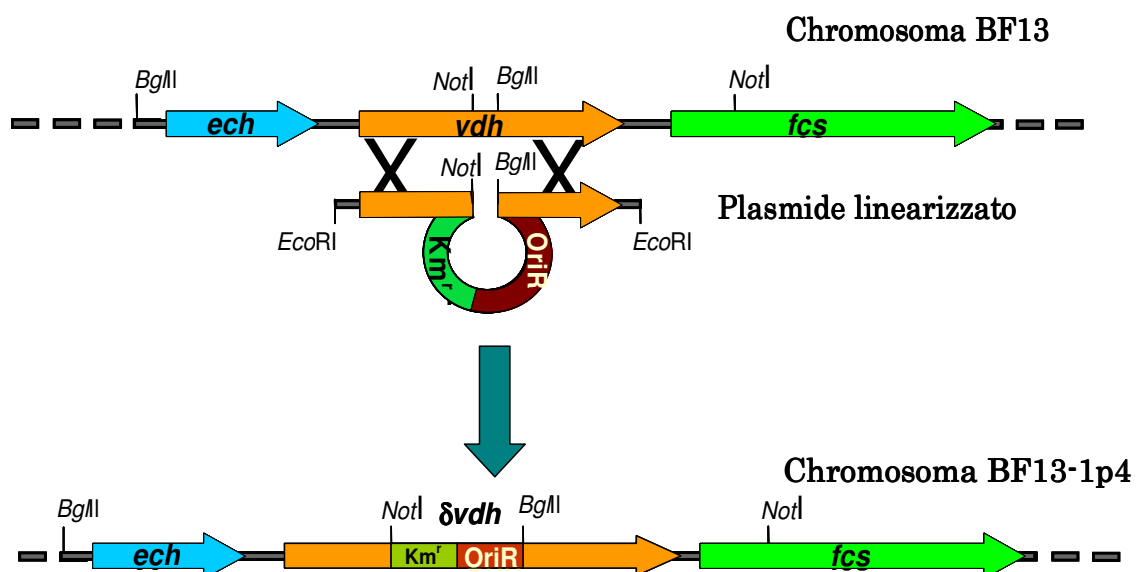
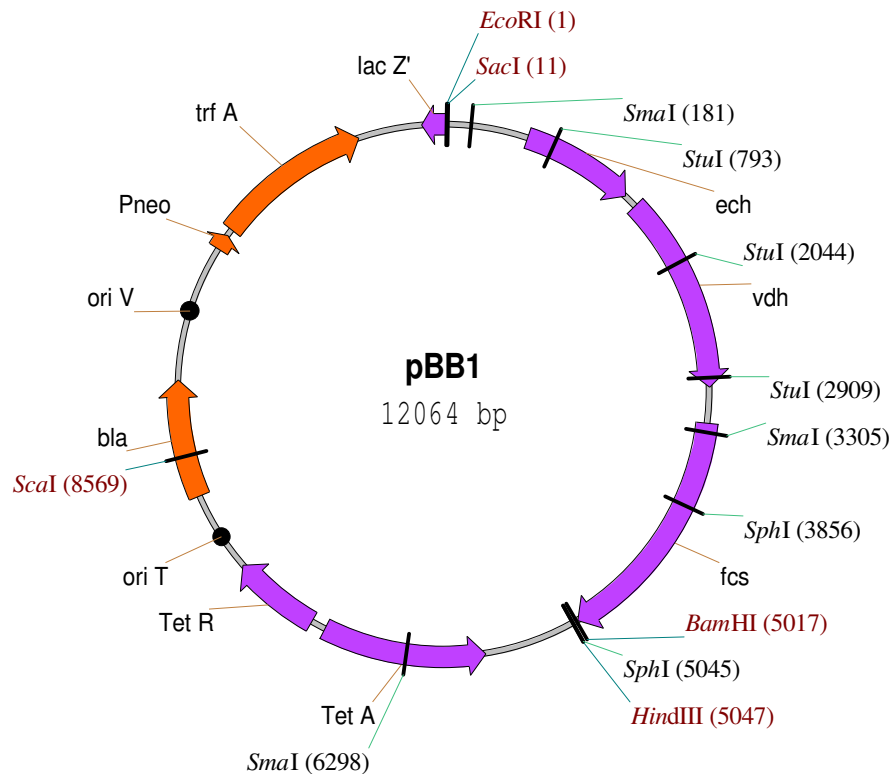


Figura 18: Mappa del plasmide utilizzato per i test di complementazione. Il plasmide conferisce al ceppo ricombinante la capacità di produrre gli enzimi necessari per catalizzare la conversione dell'acido ferulico in vanillina (Torre *et al.*, 2004).



1.10 Brevetti sulla produzione biotecnologica di vanillina

A. Utilizzo di sistemi cellulari vegetali

Nel 1991 la Escagenetics Inc. (Knuth e Sahai, 1991) ha brevettato un processo basato sull'utilizzo di sospensioni di cellule di callo di *Vanilla fragrans*, in grado di produrre e secernere una miscela di composti aromatici complessi tra i quali l'aldeide vanillica. Senza l'aggiunta di precursori, dopo 14 giorni di bioconversione, sono stati ottenuti 0,099 g L⁻¹ di vanillina, che è stata estratta in continuo mediante l'utilizzo di carbone attivo. E' stato inoltre realizzato un processo in reattore con cellule del callo di *Vanilla fragrans* previamente immobilizzate su supporto di calcio-alginato.

Nello 1993 la Mane Fils Sa. V. (Mane e Zucca, 1993) brevettò un trattamento per ottenere l'aroma naturale a partire dai baccelli di vaniglia alternativo ai tradizionali metodi di cura. Il processo prevede l'incubazione dei baccelli, a 45°C, in una sospensione acquosa contenente una miscela di enzimi, come pectinasi, cellulasi, e emicellulasi, che liberano la vanillina e gli altri composti aromatici a partire dai precursori glucosidici cui sono coniugati, riducendo notevolmente i tempi dei tradizionali processi di curing dei baccelli di vaniglia, che richiedono mediamente 1-3 mesi, con un processo biotecnologico della durata di 12 ore. L'anno successivo la Quest Int. (Barracough *et al.*, 1994) ha depositato un processo per la bioconversione dell'acido ferulico in vanillina, utilizzando tessuti ottenuti dalle radici aeree di *Vanilla fragrans*, poste a bioconvertire in tampone con carbone attivo. Questo processo ha permesso di ottenere concentrazioni di vanillina di circa 7 g kg⁻¹ (peso secco) di tessuto radicale utilizzato, con una produttività in vanillina pari a circa 0,4 g kg⁻¹ al giorno. La vanillina prodotta è stata liberata dai tessuti radicali ricorrendo ad un blando trattamento di idrolisi alcalina realizzata con KOH. Nel 1999 la David Michael and Co. Inc. hanno brevettato un processo basato sull'impiego degli enzimi *p*-idrossibenzaldeide sintasi, *p*-idrossibenzilalcol idrossilasi (citocromo P450 monossigenasi) e vanillil-alcol deidrogenasi in grado di bioconvertire l'acido *p*-cumarico in vanillina e alcol vanillico nelle cellule di *Vanilla planifolia* (Podstolski e Havkin-Frenkel, 1999). Il brevetto inoltre prevedeva il miglioramento della produzione di vanillina, facendo ricorso a colture embrionali di *V. planifolia* con aggiunta di elicitori (acido malico), precursori o intermedi della via biosintetica della vanillina o sottoponendo le colture cellulari a stress termico. Nel 2003 è stato sviluppato da Havkin-Frenkel *et al.* un metodo per incrementare la produzione di vanillina in colture di *Vanilla planifolia* ingegnerizzate. Queste ultime, rispetto a cellule non modificate geneticamente, sono capaci di produrre enzimi associati alla biosintesi di vanillina in quantità doppia. In particolare le reazioni enzimatiche interessate sono: la conversione di acido 4-cumarico in 4-idrossibenzaldeide; la conversione di acido ferulico in vanillina; l'idrossilazione dell'aldeide o dell'alcol idrossibenzilico ad aldeide o alcol 3,4-diidrossibenzilico; la metilazione della 3,4-diidrossibenzaldeide in vanillina. L'inibizione dell'enzima vanillina alcol deidrogenasi porta infine ad un accumulo della vanillina prodotta.

B. Utilizzo di sistemi microbici

Nel 1991 la Reimer GmbH ha brevettato un processo per la produzione di vanillina basato sulla conversione di eugenolo o isoeugenolo, mediante l'impiego di batteri appartenenti ai generi *Serratia*, *Clebsiella* o *Enterobacter* (Rabenhorst e Hopp, 1991).

Solo utilizzando il ceppo di *Serratia marcescens* DSM 30126 è stata ottenuta una buona quantità di vanillina a partire da eugenolo dopo 9 giorni, corrispondente a $3,8 \text{ g L}^{-1}$. Nello stesso anno Pernod Ricard depositò un brevetto per la bioconversione dell'acido ferulico o vanillico in vanillina utilizzando il ceppo *Pycnoporus cinnabarinus* CNCM n DEG I-937 o CNCM n DEG I-938 (Gross *et al.*, 1991). Utilizzando acido vanillico come substrato di bioconversione è stata ottenuta una resa molare del 35,1% e la produzione di alcol vanillico come sottoprodotto; impiegando invece $0,3 \text{ g/l}$ di acido ferulico è stata ottenuta una resa molare del 20,5% oltre alla produzione di alcol vanillico; questo processo è stato successivamente migliorato dall'Istituto Nazionale della Ricerca Agronomica (Lesage-Meessen *et al.*, 1996). Impiegando un processo a due fasi l'acido ferulico viene convertito in acido vanillico utilizzando una coltura di ascomiceti, basidiomiceti o attinomiceti, questa reazione può essere accelerata aggiungendo fosfolipidi al terreno. L'acido vanillico prodotto è stato recuperato e trasformato in vanillina ad opera di basidiomiceti, ottimizzando la trasformazione con l'aggiunta di cellobiosio e di Amberlite XAD-2 nel terreno.

Con il ceppo di *Aspergillus niger* MIC 373, in quindici giorni di bioconversione, $5,055 \text{ g L}^{-1}$ di acido ferulico sono convertiti in $3,6 \text{ g L}^{-1}$ di acido vanillico e $0,1 \text{ g L}^{-1}$ di metossiidrochinone come prodotto secondario. Con il ceppo di *Streptomyces setonii* ATCC 25497, dopo 100 ore di bioconversione $0,332 \text{ g L}^{-1}$ di acido vanillico sono stati prodotti a partire da $0,88 \text{ g L}^{-1}$ di acido ferulico. Nella seconda fase, utilizzando il ceppo di *Phanerochaete chrysosporium* MIC 247, dopo 6 giorni di bioconversione, $0,838 \text{ g L}^{-1}$ di acido vanillico sono convertiti in $0,628 \text{ g L}^{-1}$ di vanillina, oltre a $0,051 \text{ g L}^{-1}$ di alcool vanillico e $0,086 \text{ g L}^{-1}$ di metossiidrochinone come prodotti secondari. Con il ceppo di *P. cinnabarinus* MUCL 38467, dopo sette giorni di processo, sono stati ottenuti $0,481 \text{ g L}^{-1}$ di vanillina a partire da $0,941 \text{ g L}^{-1}$ di acido vanillico, inoltre è stata osservata la formazione di $0,062 \text{ g L}^{-1}$ metossiidrochinone e $0,07 \text{ g L}^{-1}$ alcool vanillico.

Utilizzando il ceppo di *Nidula niveo-tomentosa* ATCC 38357 sono stati prodotti, dopo otto giorni di bioconversione, $0,444 \text{ g L}^{-1}$ di vanillina a partire da $1,252 \text{ g L}^{-1}$ di acido

vanillico, anche in questo caso è stata osservata la produzione di metaboliti secondari come metossiidrochinone ($0,334 \text{ g L}^{-1}$) e alcool vanillico ($0,02 \text{ g L}^{-1}$).

Nel 1992 la Kraft General Foods Inc. ha depositato un brevetto per la produzione di vanillina basato sul trattamento di precursori naturali del prodotto come acido ferulico e eugenolo, impiegando microrganismi in grado di degradare naturalmente l'acido ferulico, in presenza di composti con gruppi funzionali $-\text{SH}$ come ditiotreitolo, ditioeritreitolo, glutatione o L-cisteina, come *Pseudomonas putida* ATCC 55180, *A. niger* ATCC 11414, *Pseudomonas acidovorans* ATCC 15668, *Rhodotorula glutinis* ATCC 74056 o *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. La più elevata concentrazione di vanillina pari a $0,21 \text{ g L}^{-1}$ è stata ottenuta dopo 54 giorni di bioconversione, impiegando il ceppo *P. putida* ATCC 55180 ed acido ferulico come substrato che è stato aggiunto al terreno alla concentrazione iniziale dello 0,1% in presenza di ditiotreitolo (Labuda *et al.*, 1992). Nel 1993 la Quest Int. (Markus *et al.*, 1993) brevettò un processo per la sintesi enzimatica di vanillina a partire da coniferil benzoato, isoeugenolo o eugenolo, impiegando preparazioni commerciali dell'enzima lipossidasi (Sigma L8383). Utilizzando il coniferil benzoato è stata ottenuta dopo 4 ore di processo la concentrazione massima di vanillina, pari a 2 g L^{-1} a partire da 40 g L^{-1} di substrato ed una concentrazione di lipossidasi di $0,84 \text{ g L}^{-1}$. A partire da una soluzione di 50 ml contenente 50% (v/v) isoeugenolo incubata per 4 giorni con 50 mg di lipossidasi, sono stati ottenuti 1,14 g di vanillina, che corrispondono a $22,8 \text{ g L}^{-1}$. Lo scale-up del processo, realizzato con un fermentatore da 3 L, ha consentito di ottenere $7,3 \text{ g L}^{-1}$ di vanillina a partire da 50 g L^{-1} di isoeugenolo dopo 120 ore di incubazione in presenza di $0,1 \text{ g L}^{-1}$ di lipossidasi. Impiegando eugenolo come substrato sono stati prodotti, dopo 4 giorni di incubazione, 0,025 g di vanillina a partire da una soluzione di 50 ml al 50% (v/v) di eugenolo con 50 mg di lipossidasi. La sostituzione dell'enzima commerciale, molto costoso, con un estratto proteico grezzo ottenuto da patate, soia soffiata o farine di soia depurate dalle frazioni lipidiche, ha causato un decremento delle rese in vanillina. La biotrasformazione impiegando *Saccharomyces cerevisiae* come biocatalizzatore ha consentito di ottenere dopo 20 ore di incubazione $0,189 \text{ g L}^{-1}$ di vanillina a partire da 2 g L^{-1} di isoeugenolo.

Sempre nel 1993 la Takasago International Corp. (Washisu *et al.*, 1993) ha depositato un brevetto per un processo produttivo sull'impiego di un ceppo mutante di *Pseudomonas* (numero FERM P-12689) incapace di crescere su terreno contenente vanillina, acido vanillico o alcool vanillico come unica fonte di carbonio e capace di

produrre 0,46 g L⁻¹ di vanillina, 1,05 g L⁻¹ di alcool coniferilico, 0,27 g L⁻¹ di aldeide coniferilica e 0,44 g L⁻¹ di alcool vanillico dopo 72 ore di incubazione in presenza di 0,3% (v/v) di eugenolo. Nel 1994 Mane e Zucca hanno brevettato un processo per la produzione di vanillina mediante l'impiego dell'enzima lipossigenasi, a partire da isoeugenolo, eugenolo o alcol coniferilico come substrati. Utilizzando 37,5 g L⁻¹ di isoeugenolo, incubato per 3 giorni con 1 g L⁻¹ di lipossigenasi in presenza di 2,5 g L⁻¹ di TWEEN 80, sono stati ottenuti 2,85 g L⁻¹ di vanillina; mentre utilizzando 37,5 g L⁻¹ di eugenolo, incubato nelle stesse condizioni, ma sostituendo il TWEEN 80 con carbone attivo alla concentrazione di 25 g L⁻¹, sono stati ottenuti 0,285 g L⁻¹ di vanillina. A partire da una soluzione di 100 g L⁻¹ di alcol coniferilico, incubato per 10 giorni in presenza di 1 g L⁻¹ di lipossigenasi e 2,5 g L⁻¹ di TWEEN 80, sono stati prodotti 0,24 g L⁻¹ di vanillina. Nello stesso 1994 la Reimer GmbH & Haarmann hanno brevettato un processo, per la produzione di vanillina a partire da eugenolo, basato sull'impiego del ceppo *Pseudomonas* sp. HR199, (DSM 7062 o DSM 7063). Il ceppo era in grado di convertire in 33 ore di processo, 6,5 g L⁻¹ di eugenolo in 2,365 g L⁻¹ di acido ferulico, 1,314 g L⁻¹ di acido vanillico, 1,458 g L⁻¹ di alcol coniferilico e 0,011 g L⁻¹ di aldeide coniferilica, senza rilevare la produzione di vanillina. Modificando la concentrazione di eugenolo sono stati ottenuti, 3,25 g L⁻¹ di acido vanillico a partire da 6 g L⁻¹ di eugenolo dopo 99 ore di incubazione, 3,226 g L⁻¹ di alcol coniferilico da 6,745 g L⁻¹ di eugenolo dopo 47,5 ore di bioconversione; 6,7 g L⁻¹ di acido ferulico da 13,9 g L⁻¹ di eugenolo in 78 ore di incubazione (Hopp e Rabenhorst, 1994). Nel 1996 la Orsan ha brevettato un processo per la bioconversione dell'acido ferulico in vanillina impiegando cellule immobilizzate in una matrice di calcio-alginato del ceppo *Streptomyces setonii* CNCM n I-1555 (Audras *et al.*, 1996). Dopo 3 giorni di processo sono state ottenute concentrazioni di vanillina comprese tra 0,65 e 0,9 g L⁻¹ con rese molari comprese tra il 53% ed il 69%. Durante la bioconversione è stata osservata anche la formazione di quantità variabili di acido vanillico come sottoprodotto. Un vantaggio che deriva dall'utilizzo di tale processo è associato alla possibilità di poter riutilizzare il biocatalizzatore per diversi cicli di produzione.

Nel 1997 la Institute of Food Research ha brevettato un processo basato sull'impiego di enzimi trans-ferulato:CoASH ligasi, trans-feruloil-SCoA-idratasi/4-idrossi-3-metossifenil-β-idrossipropionil-SCoA liasi e vanillina: NAD⁺ ossidoreduttasi responsabili della conversione dell'acido ferulico in vanillina e acido vanillico in *Pseudomonas fluorescens* AN103 (Narbad *et al.*, 1997).

Nel 1998 la Givaudan Roure Int., ha brevettato un processo per la bioconversione di acido ferulico in vanillina impiegando il biocatalizzatore *Streptomyces setonii* ceppo ATCC 39116. Dopo 17 ore di processo si sono ottenuti 13,9 g L⁻¹ di vanillina utilizzando 22,5 g L⁻¹ di acido ferulico, con una resa molare del 75%; nel corso del processo di bioconversione si è registrato anche la produzione di 0,4 g L⁻¹ di guaiacolo come sottoprodotto (Muller *et al.*, 1998). Nel 1999 è stato brevettato dalla Mane Fils Sa. V., un processo biochimico per la sintesi di alcune sostanze aromatiche basato sull'utilizzo di differenti metalloproteine, (Mane e Zucca, 1999). Incubando per 3 giorni 40 g L⁻¹ di isoeugenolo in presenza di 1 mg/ml di gelatina, 1 mg/ml di protoporfirina IX e 0,006 mg/ml di FeCl₂, sono stati prodotti 5,29 g L⁻¹ di vanillina; 8,4 g L⁻¹ di vanillina sono stati ottenuti dopo 24 ore da 50 g L⁻¹ di isoeugenolo aggiungendo 1 g L⁻¹ di emoglobina purificata. Rese più basse erano ottenute, utilizzando l'eugenolo come substrato.

Nel 2000 Frost della University of Michigan brevettò un processo per la bioconversione di glucosio in acido vanillico mediante l'impiego del ceppo ricombinante di *E. coli* KL7/pKL5.97A (ATCC98859) e la successiva riduzione dell'acido vanillico in vanillina da parte dell'enzima aril-aldeide deidrogenasi isolata da *N. crassa*.

Nel 2000 la Zylepsis Ltd. ha brevettato un processo per rilasciare enzimaticamente l'acido ferulico da materiali di origine vegetale, sfruttando l'enzima acido ferulico esterasi; l'acido ferulico prodotto viene poi convertito in acido vanillico, alcol vanillico e vanillina da diversi microrganismi (Cheetham *et al.*, 2000). Con *Zygorhynchus moelleri* in 5 giorni sono stati ottenuti 0,05 g L⁻¹ di vanillina e 6,6 g L⁻¹ di alcol vanillico partendo da 8 g L⁻¹ di acido vanillico. Con *Micromucor isabellinus* in 26 ore sono stati ottenuti 1,96 g L⁻¹ di vanillina da 2,87 g L⁻¹ di acido vanillico. Con *Aspergillus fumigatus* in 112 ore sono stati ottenuti 1,09 g L⁻¹ di vanillina da 1,68 g L⁻¹ di acido vanillico, mentre utilizzando un ceppo mutante di *Pseudomonas putida* incapace di crescere su vanillina sono stati prodotti 2,247 g L⁻¹ di vanillina in 43 ore da acido ferulico con una resa molare del 73%. Nel 2004 Heald *et al.* hanno sviluppato un processo per il recupero di vanillina da terreni di biotrasformazione (di acido ferulico in vanillina), derivanti da actinomiceti come *Streptomyces setonii* od *Amycolatopsis*, resistenti alla spectinomycin e capaci di produrre vanillina senza guaiacolo. Il terreno di bioconversione viene precipitato in forma cristallina o microcristallina ed il materiale solido contenente vanillina è purificato per contatto con un fluido supercritico o un gas, come diossido di carbonio, ad una temperatura inferiore ai 25°C.

Nel 2006 Havkin-Frenkel *et al.* hanno brevettato un sistema di produzione di vanillina attraverso organismi transgenici, utilizzando come substrato acido caffeico o suoi derivati esterificati. La sintesi di vanillina può essere condotta da procarioti come *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp oppure da eucarioti come *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae* trasformati in modo da esprimere una 3-O-metiltrasferasi, che catalizza la metilazione dell'acido caffeico in acido ferulico e di una 4-idrossibenzaldeide sintasi, che converte quest'ultimo in vanillina; alternativamente i microrganismi possono esprimere l'enzima enoil-SCoA idratasi/liasi che catalizza la conversione di acido ferulico in vanillina. Nel 2006 Zhihao *et al.* hanno brevettato un sistema per la produzione di vanillina a partire da olio di crusca di riso attraverso fermentazione e bioconversione, processo che prevede l'intervento di due microrganismi differenti. *Aspergillus niger* CGMCC 0774 è impiegato per idrolizzare sottoprodotti contenenti olio di crusca di riso con produzione di acido ferulico ed acido vanillico. Il liquido di fermentazione è quindi trattato per rimuovere il micelio ed inoculato con *Pycnoporus cinnabarinus* CGMCC 1115, che produce vanillina operando una reazione di conversione per riduzione. Il prodotto di bioconversione è estratto con un solvente organico e, dopo eluizione con etanolo, è concentrato, cristallizzato e ricristallizzato per ottenere vanillina con un grado di purezza elevato.

MATERIALI E METODI

2 *Microrganismi utilizzati*

Ceppi	Genotipo	Fonte
<i>P. fluorescens</i>		
BF13-1p4	Derivato da BF13; ferulato negativo; Km ^R	Questo laboratorio
<i>E. coli</i>		
K12 JM109	recA1 endA1 gyrA96 thi-I hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) supE44 relA1 λ ⁻ Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB ⁺ lacI ^q ZΔM 15].	Promega
K12 MG1655	F ⁻ λ ⁻ ilvG-rfb-50-rph-1	Dott.P.C.Cirino Dipartimento di Ingegneria Chimica Penn State University
B CGCS 5365	wild type, F ⁻	Collezione CGCS. The Coli Genetic Stock Center, Yale University
JM109 FR13	Derivato da JM109 contenente i geni <i>ech</i> , <i>δvdh</i> e <i>fcs</i> sotto il controllo del promotore di BF13 integrati nel locus <i>LacZ</i> , Km ^R .	Questo lavoro

2.1 Plasmidi

pBB1: ori RK2, Tc^R, Amp^R (Torre *et al.*, 2004)

Derivato di pJB3Tc19 (vettore ad ampio spettro d'ospite; ori RK2; Ap^R Tet^R), contenente i geni *ech*, *δvdh*, *fcs* sotto il controllo del promotore di BF13; 12,7 Kb

pPR9TT: ori RK2, Ap^R Cm^R (Santos *et al.*, 2001)

Derivato di pPR9, (ori RK2 contenente il gene *lacZ*, Ap^R Cm^R, 8,9 kb) nel quale un frammento di 410 bp *Bam*HI-*Bg*II, contenente i terminatori *rrnBT1T2*, è stato clonato nel sito *Bg*II di pPR9; 9,3 Kb.

pLOI2227: ori pSC101, Km^R (Martinez-Morales *et al.*, 1999)

Replicone pSC101 temperatura-sensibile; 3,4 kb.

pFR0: ori RK2, Amp^R Cm^R (Questo lavoro)

Derivato di pPR9TT, contenente i geni *ech*, *δvdh* e *fcs* sotto il controllo del promotore di BF13; 11,3 Kb

pFR1: ori RK2, Amp^R Cm^R (Questo lavoro)

Derivato di pFR0, contenente la porzione 3' terminale del gene *lacZ*; 14,4 Kb

pFR2: ori pSC101, Km^R (Questo lavoro)

Derivato di pLOI2227, contenente i geni *ech*, *δvdh*, *fcs* sotto il controllo del promotore di BF13 e la porzione 3' terminale del gene *LacZ*

2.2 Terreni di coltura, condizioni di crescita e conservazione dei ceppi

Per la coltivazione ed il mantenimento dei ceppi selvatici e ricombinanti è stato utilizzato il terreno complesso Luria-Bertani (LB, Sambrook *et al.*, 1989).

Per la crescita del ceppo ricombinante BF13-1p4(pBB1) è stato utilizzato sia il terreno complesso LB che il terreno salino M9 (Miller, 1972), addizionato con glucosio (0,5% w/v) o sodio-succinato (0,1-0,6% w/v) come fonte di carbonio.

2.2.1 Terreni colturali

LB (Luria-Bertani). Composizione per litro di terreno

Componenti*	Quantità (g)
Tryptone	10
Estratto di lievito	5
NaCl	5

TERRENO SALINO M9. Composizione per litro di terreno

Componenti*	Quantità (g)
Na ₂ HPO ₄	6,00
KH ₂ PO ₄	3,00
NaCl	0,50
NH ₄ Cl	1,00
CaCl ₂	0,11
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,24
Fonte di carbonio	a) Sodio succinato (0,1-0,6%) b) Glucosio (0,5%)

*Per terreni solidi si aggiungono 15g L⁻¹ di Bacto-agar

Nella preparazione del terreno M9 il solfato di magnesio, il cloruro di calcio e la fonte di carbonio sono aggiunti al terreno salino dopo sterilizzazione in autoclave.

Per la coltivazione dei ceppi ingegnerizzati, sono stati utilizzati terreni di coltura emendati con antibiotico, come richiesto.

- I ceppi di *E. coli* contenenti i plasmidi pBB1, pPR9TT, pFR0 pFR1 sono stati coltivati su LB addizionato con ampicillina 100 µg/ml
- I ceppi di *E. coli* JM109(pFR2) e FR13 sono stati coltivati su LB addizionato con Kanamicina rispettivamente a 30 µg/ml e 25 µg/ml
- Il ceppo *P. fluorescens* BF13-1p4(pBB1) è stato coltivato su terreno LB addizionato con tetraciclina 40 µg/ml.

2.2.2 Condizioni di crescita

Per la coltivazione dei microrganismi in terreno liquido, sono state utilizzate beute di tipo Erlenmeyer da 250-500 ml, mantenendo un rapporto 10:1 volume della beuta:volume del terreno di coltura, in modo da garantire un'adeguata ossigenazione del mazzo di coltura. Le colture sono state incubate in shaker orbitale a 180 rpm.

Per la crescita in bioreattore del ceppo *P. fluorescens* BF13-1p4(pBB1) sono stati utilizzati fermentatori da banco da 2 e 15 L.

- I ceppi di *E. coli* wild type e i ceppi contenenti i plasmidi pBB1, pPR9TT, pFR0 pFR1 sono stati coltivati a 37°C
- Il ceppo di *E. coli* JM109(pFR2) è stato coltivato a temperatura permissiva (30°C) o a temperatura non permissiva (44°C) in base alle esigenze sperimentali
- Il ceppo di *E. coli* JM109 FR13 è stato mantenuto a 44°C
- Il ceppo *P. fluorescens* BF13-1p4(pBB1) è stato coltivato a 30°C.

I ceppi sono stati conservati a +4°C su terreno LB-agar eventualmente emendato con l'antibiotico appropriato.

La conservazione di lunga durata è stata effettuata congelando i ceppi a -80°C in terreno LB emendato con glicerolo (20%).

2.2.3 Curva di crescita

La curva di accrescimento del ceppo ricombinante BF13-1p4(pBB1) è stata determinata, coltivando il microrganismo in bioreattore (da 2 L) in terreno LB di grado industriale e misurando (ogni 60 minuti) la densità ottica della coltura.

Le misurazioni di assorbanza (OD₆₀₀ nm) sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro Cary 50 Bio (Varian, Italia).

L'inoculo della coltura è stato effettuato con una precoltura in fase stazionaria, in modo di avere un OD₆₀₀ circa di 0,1.

Se necessario, le letture spettrofotometriche sono state realizzate diluendo le sospensioni cellulari fino ad ottenere un valore di densità ottica compresa tra 0,1 e 1.

2.3 Bioreattore

Il bioreattore ad agitazione meccanica Applikon utilizzato per la crescita di *P. fluorescens* BF13-1p4(pBB1) con recipiente autoclavabile, in vetro borosilicato del volume di 2 L e dispositivi per il controllo del pH, della temperatura e del livello di ossigeno disciolto.

La temperatura è mantenuta costante tramite uno scambiatore di calore esterno.

L'agitazione è garantita da due turbine di tipo Rushton (Ø 45 mm – h 12 mm).

2.4 Preparazione di cellule competenti e trasformazione

L'induzione dello stato di competenza in cellule di *E. coli* è stato ottenuto mediante trattamento chimico con sali di calcio utilizzando il protocollo descritto nel Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1997).

2.4.1 Trattamento con CaCl_2

Nelle trasformazioni effettuate utilizzando vettori contenenti l'origine di replicazione RK2, la rigenerazione è stata fatta coltivando le cellule trasformate a 37°C, in terreno LB, con i vettori con origine temperatura sensibile pSC101, la rigenerazione e la selezione dei trasformanti è stata fatta a 30°C.

2.5 Analisi molecolare

L'estrazione del DNA genomico dai ceppi ricombinanti di *E. coli*, è stata effettuata con il kit Fermentas (Genomic DNA Purification Kit), seguendo le istruzioni della casa produttrice.

L'estrazione del DNA plasmidico è stata eseguita utilizzando la tecnica della lisi alcalina descritta da Birnboim (1983).

Per la costruzione dei plasmidi ricombinanti, il DNA è stato digerito con enzimi di restrizione della Invitrogen, utilizzando i protocolli suggeriti dalla ditta produttrice. L'analisi elettroforetica del DNA è stata condotta su gel di agarosio (1-1,5% w/v)-TAE (40mM Tris/Acetato, 1mM EDTA) ed il DNA è stato visualizzato su gel, con l'ausilio di luce UV, previo colorazione con bromuro di etidio (0,3 µg/ml). La dimensione apparente dei frammenti di DNA, è stata stimata, sulla base della mobilità elettroforetica utilizzando un marker di peso molecolare come riferimento (frammenti di λ *HindIII* o 1Kb ladder, Invitrogen).

Per il recupero del DNA dal gel di agarosio è stato utilizzato il kit "DNA Purification System" (Promega) secondo le istruzioni della ditta produttrice.

Le reazioni di ligazione sono state effettuate utilizzando T4 DNA ligasi (Roche) secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice.

2.6 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

L'integrazione dei geni, che codificano per gli enzimi coinvolti nella bioconversione dell'acido ferulico in vanillina, nel cromosoma di *E. coli* JM109 è stata effettuata mediante PCR, utilizzando la coppia di primers (FFZ_R e FFZ_F).

La coppia di primers amplifica una porzione della sequenza cromosomale del gene *LacZ* e la sequenza C-terminale del gene *fcs* presente nel vettore di integrazione pFR2 (vedi Sezione 2.7).

FFZ_R 5'-AATGGCTTTCGCTACCTGGA-3'

FFZ_F 5'-CTTCTACTGCTCGGGGGATG-3'

La reazione di PCR è stata eseguita su un volume finale di 50 µl in provette da 0,2 ml, con termociclatore GeneAmp PCR Systems 9700, utilizzando *Taq* DNA polimerasi della Qiagen. La miscela di reazione tipo era così composta:

DNA	0,5-1 µl
Buffer 10x	5 µl
Sol.Q 5x	10 µl
dNTP	1 µl
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse	1 µl
Taq polimerasi	0,5 µl

Il programma utilizzato per la reazione di amplificazione è il seguente:

Denaturazione iniziale	95°C per 5 min	
Denaturazione	94°C per 30 sec	} x 30 cicli
Annealing	62°C per 30 sec.	
Estensione	72°C per 3 min.	
Estensione finale	68°C per 7 min	

2.7 Costruzione del vettore di integrazione pFR2

La costruzione del plasmide ricombinante pFR2, utilizzato per integrare nel cromosoma di *E. coli* i geni che codificano per gli enzimi responsabili della conversione dell'acido ferulico in vanillina, è stata realizzata in tre passaggi:

A. Costruzione del vettore ricombinante pFR0

La costruzione del plasmide pFR0 è stata realizzata clonando nel vettore pPR9TT le sequenze di pBB1 che corrispondono ai geni catabolici di *P. fluorescens* BF13.

Il plasmide pBB1 è stato digerito con le endonucleasi di restrizione *Hind*III e *Sac*I; generando due frammenti di 3158 e 5036 bp, che sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio. Dopo elettroforesi il frammento di 5036 bp, che contiene i geni *ech* e *fcs* da *P. fluorescens* BF13 è stato eluito da gel.

Il plasmide pPR9TT è stato anch'esso digerito *Hind*III e *Sac*I, ottenendo tre frammenti di restrizione di 1178, 1956 e 6243 bp. Dopo separazione mediante elettroforesi su gel d'agarosio il frammento di 6243 bp, contenente il vettore privo del gene *lacZ*, è stato eluito da gel e ligato con il frammento da 5.036 bp. Il plasmide ricombinante così ottenuto è stato denominato pFR0 .

B. Costruzione del vettore ricombinante pFR1

Il sito unico *Eco*RI presente sul plasmide pFR0 è stato utilizzato per il clonaggio di una porzione del gene *lacZ*.

A tale scopo il plasmide pPR9TT è stato digerito con *Eco*RI, ottenendo tre frammenti di restrizione rispettivamente di 484, 3016 e 5877 bp; dopo separazione elettroforetica il frammento da 3016 bp (contenente una porzione del gene *lacZ*), è stato eluito da gel e ligato con il plasmide pFR0 linearizzato con *Eco*RI. Il plasmide risultante è stato chiamato pFR1.

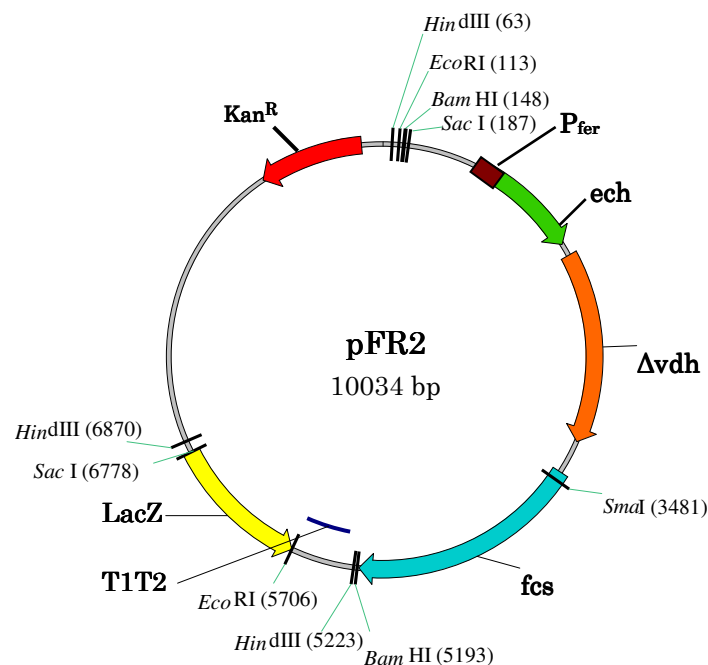
C. Costruzione del vettore di integrazione pFR2

La cassetta catabolica e la porzione del gene bersaglio *lacZ*, sono stati infine clonati nel vettore di integrazione pLOI2227.

Il plasmide ricombinante pFR1 è stato digerito con l'enzima *SacI*, ottenendo due frammenti di restrizione rispettivamente di 6591 e 7715 bp. Dopo separazione elettroforetica su gel d'agarosio, il frammento da 6591 bp, contenente la sequenza dei geni *ech*, *fcs* e *LacZ* è stato clonato nel vettore pLOI2227 linearizzato con l'enzima *SacI*. Il plasmide risultante (Figura 19) è stato chiamato pFR2.

Figura 19: Mappa del plasmide pFR2.

Sulla mappa sono indicati: i geni *fcs*, *ech* e *vdh** (che codifica per una vanillina deidrogenasi inattiva), il promotore P_{fer} che controlla l'espressione dei geni per il catabolismo dell'acido ferulico in *P. fluorescens* BF13, la porzione C-terminale del gene *LacZ*, il gene per la resistenza alla kanamicina (Km^R), il terminatore di trascrizione (T1 T2).



2.8 *Esperimenti di bioconversione*

2.8.1 *Produzione della biomassa*

a) *P. fluorescens* BF13-1p4(pBB1)

La produzione di biomassa per il ceppo ricombinante BF13-1p4(pBB1) è stata effettuata coltivando il microrganismo in beuta o in reattore da banco.

Per la produzione di biomassa in beuta è stato utilizzato terreno LB (con componenti di grado analitico o di grado industriale) o il terreno salino M9, emendato con glucosio (0,5% w/v) o sodio succinato (0,1%-0,6% w/v). L'inoculo (OD_{600} iniziale=0,1), è stato effettuato a partire da una coltura cresciuta in beuta, fino in fase stazionaria, coltivata nello stesso terreno e la coltura è stata incubata a 30°C in agitazione.

Nelle prove in LB, 1,5 ore dopo l'inoculo è stato aggiunto alla coltura acido ferulico (0,05% w/v) e dopo 1 ora di induzione le cellule sono state raccolte per condurre le prove di bioconversione.

Negli esperimenti effettuati con cellule provenienti da colture cresciute terreno salino M9, sono state utilizzate cellule provenienti da colture in fase esponenziale di accrescimento o da colture in fase stazionaria.

Per la produzione della biomassa in bioreattore è stato utilizzato il terreno LB di grado industriale. Per l'inoculo del fermentatore da 2 L, sono state utilizzate cellule provenienti da colture in fase esponenziale (OD_{600} 2,0-2,5), cresciuta in beuta (OD_{600} iniziale dopo l'inoculo=0,2).

Il microrganismo è stato coltivato a 30°C nelle condizioni descritte nella Tabella 5. La percentuale di ossigeno disciolto della coltura è stato mantenuto al 30% mediante aumenti progressivi della velocità della girante, fino a raggiungere una velocità massima di 600 rpm. Dopo 1,5 ore dall'inoculo (OD_{600} 2,6-2,9) è stato aggiunto acido ferulico (0,05%w/v) e le cellule sono state raccolte dopo un'ora dall'aggiunta dell'induttore (OD_{600} 3,8-4,0).

b) *E. coli* FR13 e ceppi di *E. coli* trasformati con il plasmide pFR0

Per la produzione di biomassa del ceppo FR13 e dei ceppi di *E. coli* contenenti il plasmide pFR0 è stato utilizzato terreno LB di grado analitico.

La precoltura è stata cresciuta in beuta fino alla fase stazionaria, alle temperature rispettivamente di 37°C (ceppi con plasmide pFR0) e 44°C (ceppo FR13).

La biomassa è stata raccolta per centrifugazione e risospesa in terreno LB in rapporto 1:1 e messa ad incubare a 30°C per il tempo necessario per avere una duplicazione cellulare (~3 ore).

c) Modalità di conservazione della biomassa

Nelle prove effettuate per individuare una modalità di conservazione della biomassa:

Il ceppo di BF13-1p4(pBB1), è stato cresciuto, sino in fase stazionaria, su terreno salino M9 e sodio succinato (0,6% w/v), le cellule sono state successivamente recuperate per centrifugazione (15' x 6000 rpm) e risospese in:

- terreno LB emendato con sali e glicerolo 4,4% (Tabella 6) e conservate a -80°C,
- tampone salino M9 e conservate a +4°C (Risultati e Discussione, Sez. 4.7).

Il ceppo FR13 stato cresciuto a 30°C, il tempo necessario ad ottenere una duplicazione cellulare, la biomassa raccolta per centrifugazione (15' x 6000 rpm) è stata risospesa in tampone salino M9 e conservate a +4°C (Risultati e Discussione, Sez. 5.2.2).

Tabella 5: Parametri e condizioni di crescita in fermentatore da 2 L.

Terreno di crescita	LB (grado industriale)
Volume di terreno	1L
OD₆₀₀ inoculo	0,2
Temperatura	30°C
[O₂]_i	30% di saturazione
Agitazione	450-600 rpm
Flusso Aria	2,23 v/v/m
pH iniziale	6,5
Acido ferulico	500 mg/L
OD₆₀₀ iniziale/tempo	2,6-2,9/1hr
Densità cellulare finale	3,8-4,0

Tabella 6 **Terreno LB-sali minerali-glicerolo.** Composizione per litro di terreno

Componenti	Quantità (g)
Tryptone	10,00
Estratto di lievito	5,00
NaCl	5,00
K ₂ HPO ₄	6,30
KH ₂ PO ₄	1,80
Na-citrato	0,45
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,09
Glicerolo	44,00

2.8.2 Recupero della biomassa

Le cellule sono state separate per centrifugazione (5' x 6000 rpm), lavate con tampone fosfato salino M9 pre-raffreddato (temperatura +4°C), e risospese in tampone di bioconversione a concentrazione finale variabile comprese tra 3-6 g (peso umido)/ l in base alle esigenze sperimentali.

2.8.3 Acido ferulico

Le soluzioni acquose di acido ferulico (2% w/v) sono state preparate solubilizzando il composto in ambiente alcalino (pH 0,5-10,5), mediante l'aggiunta di NaOH 1M, e riportando il pH a 7 con HCl al 37%. La soluzione è stata sterilizzata mediante filtrazione con filtri a membrana di nitrato di cellulosa (0,22 µm).

2.8.4 Tampone di bioconversione

Gli esperimenti di bioconversione sono stati condotti in tampone fosfato salino addizionato con acido ferulico come substrato di bioconversione (Tabella 7).

Tabella 7: Tampone di bioconversione. Composizione per litro di terreno

Componenti	Quantità (g)
Na ₂ HPO ₄	6
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0,5
NH ₄ Cl	1
Acido ferulico*	1-5
Estratto di lievito*	0,0005

*La concentrazione finale dell'acido ferulico nei vari esperimenti è compresa tra 1 e 5 g L⁻¹.

*L'estratto di lievito viene aggiunto al tampone di bioconversione solo negli esperimenti condotti con il ceppo ricombinate di *E. coli* FR13.

Il tampone di bioconversione utilizzato negli esperimenti condotti con il ceppo *E. coli* FR13 è stato emendato con estratto di lievito (0,005% w/v) come fonti di fattori nutrizionali.

2.8.5 Bioconversione

I saggi sono stati allestiti in beuta, (da 100 ml), in 10 ml di tampone di bioconversione con quantità variabile di acido ferulico (1-5 g/l) e di biomassa: 3-6 g (peso umido)/l per BF13-1p4(pBB1) e 4,5 g (peso umido)/l per *E. coli* FR13. Le bioconversioni sono state effettuate in agitazione (180 rpm) a 30°C. Per quantificare il consumo di substrato e la produzione di vanillina, ad intervalli regolari, sono state prelevate aliquote di 100 µl e, dopo separazione delle cellule per centrifugazione (13000 rpm per 5 minuti), un'aliquota è stata analizzata direttamente per cromatografia HPLC.

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte in duplicato.

2.8.6 Analisi in HPLC

Per la determinazione quantitativa dell'acido ferulico consumato, della vanillina e dell'acido vanillico prodotti, sono state eseguite analisi HPLC con un cromatografo liquido Varian ProStar equipaggiato con duplice pompa, iniettore Rhodyne 7125, loop da 20 µl, ed un rivelatore spettrofotometrico a lunghezza d'onda variabile. L'acquisizione dei dati è stata garantita dal programma System Control Varian Star gestito da computer.

La miscela di composti presenti nel supernatante è stata risolta mediante una colonna Luna 2.5 µm C18(2)-HST (50 x 2,0 mm; Phenomenex, USA). I composti sono stati analizzati mediante eluizione isocratica (fase mobile: metanolo 25%; acido acetico 1%; flusso: 0,2 ml/min). I campioni opportunamente diluiti sono stati analizzati a due lunghezze d'onda (235 e 260 nm).

I picchi cromatografici sono stati identificati per confronto con i profili ottenuti iniettando i composti puri, mentre l'analisi quantitativa dei prodotti (acido ferulico, aldeide vanillica, ed acido vanillico) è stata effettuata confrontando le aree dei picchi con le rette di taratura che sono state ricavate elaborando i dati ottenuti per ciascun composto, da soluzioni a titolo noto comprese tra 0,05 e 1 mg/ml.

Nelle condizioni cromatografiche impiegate i tempi di ritenzione dei composti (substrato e prodotti) sono: acido ferulico 8 minuti, aldeide vanillica 6 minuti e acido vanillico 4 minuti.

2.9 Prodotti chimici

Sono stati utilizzati prodotti chimici altamente puri, l'acido ferulico è stato acquistato dalla ditta Sigma-Aldrich (Italia); tutti i composti chimici sono stati forniti dalla Carlo Erba, mentre i componenti dei terreni microbiologici e l'agar sono stati acquistati presso la DB Biosciences. I componenti del terreno LB, del terreno M9 e l'acido ferulico di grado industriale sono stati forniti dalla ditta Gnosis s.p.a di Desio (MI).

3 *Scopo della tesi*

Scopo di questa tesi di dottorato è stato lo sviluppo di biocatalizzatori efficienti per la produzione di vanillina da materie prime rinnovabili, in particolare da acido ferulico.

Il lavoro si è avvalso delle conoscenze acquisite presso il laboratorio di Chimica delle Fermentazioni (DABAC, Università della Tuscia), sulla degradazione dell'acido ferulico ad opera di ceppi batterici ascrivibili al genere *Pseudomonas* e sull'espressione in *Escherichia coli* dei geni responsabili del catabolismo di composti aromatici, in particolare nella degradazione dell'acido ferulico.

Le sperimentazioni hanno riguardato:

1. L'ottimizzazione della coltivazione e dell'impiego di cellule del ceppo ingegnerizzato di *Pseudomonas fluorescens* BF13-1p4(pBB1) per la produzione di vanillina da acido ferulico.
2. La costruzione di un ceppo ingegnerizzato di *E. coli* JM109 in grado di convertire l'acido ferulico in vanillina e l'ottimizzazione delle condizioni di impiego del nuovo biocatalizzatore.

RISULTATI e DISCUSSIONE

4 *Pseudomonas fluorescens* BF13-1p4(pBB1)

Nella prima parte di questo progetto, l'attività di ricerca si è concentrata sulla produzione di vanillina, a partire da acido ferulico, mediante cellule resting del ceppo *P. fluorescens* BF13-1p4(pBB1) [vedi Introduzione].

In particolare, l'attività ha riguardato l'ottimizzazione delle condizioni per la coltivazione del microrganismo e per il successivo impiego delle cellule nella conversione dell'acido ferulico in vanillina.

Il microrganismo è stato cresciuto sia in beuta che in reattore da banco (2L e 15L), mentre le prove di bioconversione sono state eseguite tutte in beuta.

Nelle prove preliminari è stato considerato, per la produzione della biomassa

1. lo stato fisiologico della coltura
2. l'aggiunta dell'acido ferulico (come induttore) nel terreno di crescita
3. il grado di purezza dei componenti del terreno di coltura
4. le modalità di induzione

per la bioconversione dell'acido ferulico in vanillina

5. la concentrazione del substrato (acido ferulico)
6. il pH del tampone di bioconversione.

Nelle prove successive è stato considerato,

per la produzione della biomassa in bioreattore

1. il tempo di induzione
2. il pH del terreno di crescita

per la bioconversione dell'acido ferulico in vanillina

3. la composizione del tampone di bioconversione
4. il grado di purezza del substrato (acido ferulico)
5. la concentrazione di biomassa nel mezzo di bioconversione.

Infine, sono state condotte sperimentazioni per valutare

1. il possibile impiego di materie prime a basso costo per la crescita della biomassa
2. identificare le modalità ottimali con le quali fornire il substrato nelle prove di bioconversione
3. le modalità di conservazione della biomassa.

Prove in beuta

4.1 Ottimizzazione della produzione di biomassa

4.1.1 Stato fisiologico delle cellule ed aggiunta di acido ferulico al mezzo di coltura

Esperienze precedenti condotte nel nostro laboratorio avevano mostrato che, la capacità di cellule resting del ceppo wild type *P. fluorescens* BF13 di accumulare quantità elevate di acido vanillico, (intermedio del catabolismo dell'acido ferulico) e la velocità di consumo del substrato (acido ferulico) dipendeva in modo significativo dalle modalità di coltivazione del microrganismo, ed in particolare, dalla presenza di un induttore (acido ferulico o acido *p*-cumarico) nel mezzo di coltura e dalla fase di accrescimento della coltura utilizzata per la produzione della biomassa (Barghini *et al.*, 1998). Con il mutante ingegnerizzato BF13-1p4(pBB1) si è quindi cercato innanzitutto di individuare le condizioni colturali ottimali per produrre biomassa che potesse essere utilizzata efficientemente nelle prove di bioconversione.

La produzione in *P. fluorescens* BF13 di enzimi chiave implicati nella degradazione dell'acido ferulico, come la feruloil-CoA sintetasi, è stimolata in modo significativo dalla presenza di acido ferulico nel mezzo di coltura (Tabella 8). Al contempo, le concentrazioni elevate di vanillina, che si accumulano coltivando il ceppo BF13-1p4(pBB1) in presenza di acido ferulico, è tossica per il microrganismo; questo ceppo, infatti, al contrario del wild type, non cresce in presenza di concentrazioni di acido ferulico superiori allo 0,2% (w/v). Nelle prime prove si è cercato quindi di valutare l'opportunità di coltivare il microrganismo in presenza di basse concentrazioni di acido ferulico e la durata della fase di induzione. Il microrganismo è stato fatto crescere in beuta in terreno LB e LB addizionato con acido ferulico (0,05% w/v), utilizzando componenti di grado analitico, come descritto in Materiali e Metodi (Sezione 2.8.1).

Per la bioconversione sono state utilizzate cellule provenienti da colture sia in fase esponenziale che stazionaria, come mostrato nella Tabella 9.

Tabella 8: Attività (U/mg di proteine) dell'enzima feruloil-CoA sintetasi in cellule del ceppo selvatico di *P. fluorescens* BF13 cresciute in terreno salino M9 contenente glucosio o acido ferulico come fonte di carbonio.

Ceppo	Attività della feruloil-CoA sintetasi (U/mg di proteine)	
	Glucosio	Acido ferulico
BF13	nd*	0,190 ± 0,01

*valore inferiore a 0,003 U/mg di proteine

Tabella 9: Condizioni colturali utilizzate per la produzione di biomassa.

Terreno LB	Tempo di crescita (Ore)	Assorbanza (OD ₆₀₀) §
Senza ac.ferulico	4	1,50 ± 0,30
Senza ac.ferulico	20	4,30 ± 0,21
Con ac.ferulico	4	1,40 ± 0,17
Con ac.ferulico	20	4,80 ± 0,09

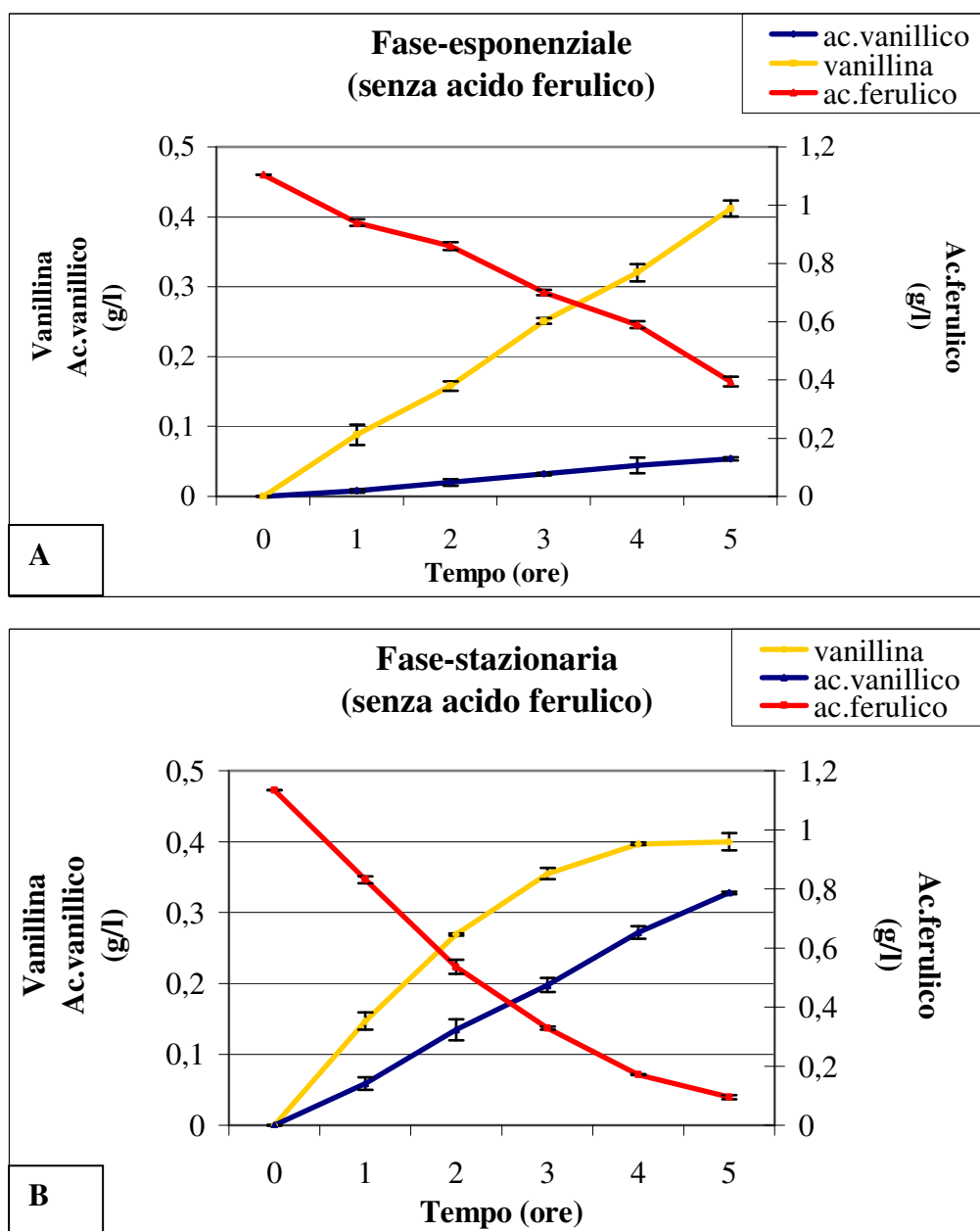
§ I valori riportati in Tabella si riferiscono alla media ± S.D. di tre prove indipendenti.

Nella Figura 20 e 21 vengono riportati i risultati delle bioconversioni effettuate con cellule provenienti da colture in fase esponenziale o stazionaria, cresciute in presenza o assenza di acido ferulico.

Nei singoli esperimenti sono stati determinati:

- la velocità di consumo dell'acido ferulico
- la massima quantità di vanillina prodotta
- l'eventuale formazione di altri metaboliti (acido vanillico).

Figura 20: Produzione di vanillina e consumo di acido ferulico con cellule provenienti da colture in fase esponenziale (A) e in fase stazionaria (B) cresciute su terreno LB.



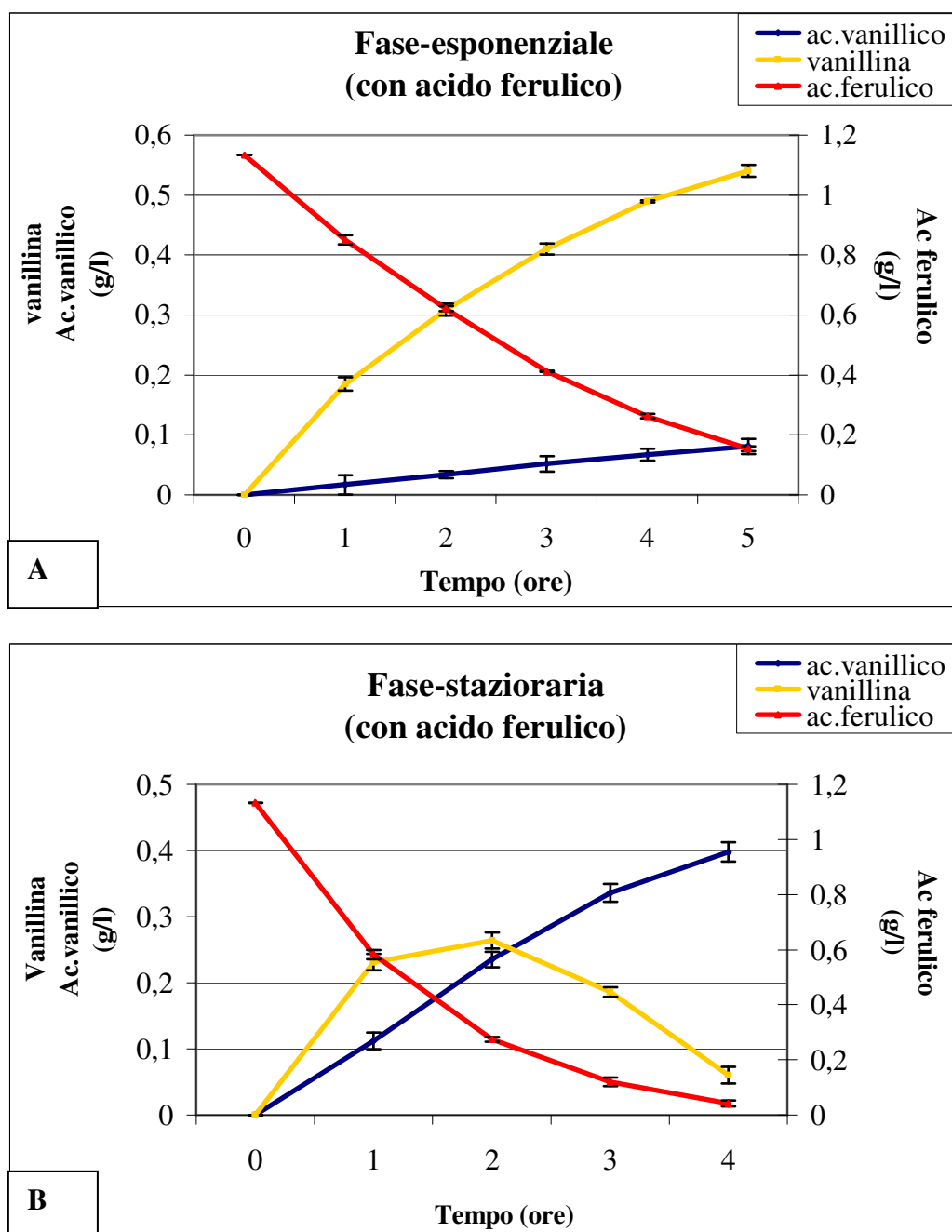
Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 6 g (peso umido)/l di cellule resting e 1,1 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti.

I risultati mostrati nella Figura 20 indicano che, lo stato fisiologico della coltura non sembra avere alcun effetto sulla quantità di vanillina prodotta, se si utilizzano cellule cresciute in assenza di acido ferulico. Dopo 5 ore di incubazione la concentrazione di vanillina nel mezzo di bioconversione era rispettivamente di $0,412 \pm 0,011$ g/l (cellule provenienti da colture in fase esponenziale; Figura 20A) e $0,400 \pm 0,012$ g/l (fase stazionaria; Figura 20B).

Differenze marcate si osservano invece sulla velocità di consumo del substrato e sulla formazione di acido vanillico. Utilizzando cellule provenienti da colture in fase stazionaria si osserva un maggior consumo del substrato (dopo 5 ore l'acido ferulico è stato quasi completamente consumato, $0,095 \pm 0,007$ residui) accompagnato da una maggiore ossidazione della vanillina ad acido vanillico ($0,328 \pm 0,017$ g/l).

Nelle stesse condizioni (5 ore di incubazione), utilizzando cellule provenienti da colture in fase esponenziale di crescita, a parità di vanillina prodotta, si osserva un minor consumo di acido ferulico ($0,394 \pm 0,017$ g/l residui) ed una minore formazione di acido vanillico ($0,054 \pm 0,025$ g/l).

Figura 21: Produzione di vanillina e consumo di acido ferulico con cellule prelevate da colture in fase esponenziale (A) e in fase stazionaria (B) cresciute su terreno LB e acido ferulico (0,05% w/v).



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 6 g (peso umido)/l di cellule resting e circa 1,1 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti.

Cellule cresciute in presenza di induttore e prelevate in fase di accrescimento esponenziale consentono di ottenere quantità elevate di vanillina (Figura 21A). Dopo 5 ore di bioconversione l'acido ferulico è stato quasi totalmente consumato e la quantità di vanillina prodotta è dell'ordine di $0,540 \pm 0,001$ g/l.

L'aggiunta dell'induttore (acido ferulico) al mezzo di coltura permette di ottenere, nella fase di bioconversione, un incremento nella resa molare (espressa come moli di vanillina prodotta per moli di acido ferulico consumato) del 33,3%.

Una crescita prolungata in presenza di acido ferulico (Figura 21B), stimola la capacità del microrganismo di consumare rapidamente il substrato, ma non determina un accumulo significativo di vanillina durante il processo di bioconversione.

E' possibile ipotizzare che la vanillina prodotta, durante la crescita in presenza di acido ferulico, essendo tossica per le cellule, stimoli la produzione di enzimi in grado di ossidare questo composto a prodotti meno tossici come l'acido vanillico.

4.1.2 Effetto del grado di purezza degli ingredienti utilizzati per la preparazione del terreno di coltura sul processo di bioconversione

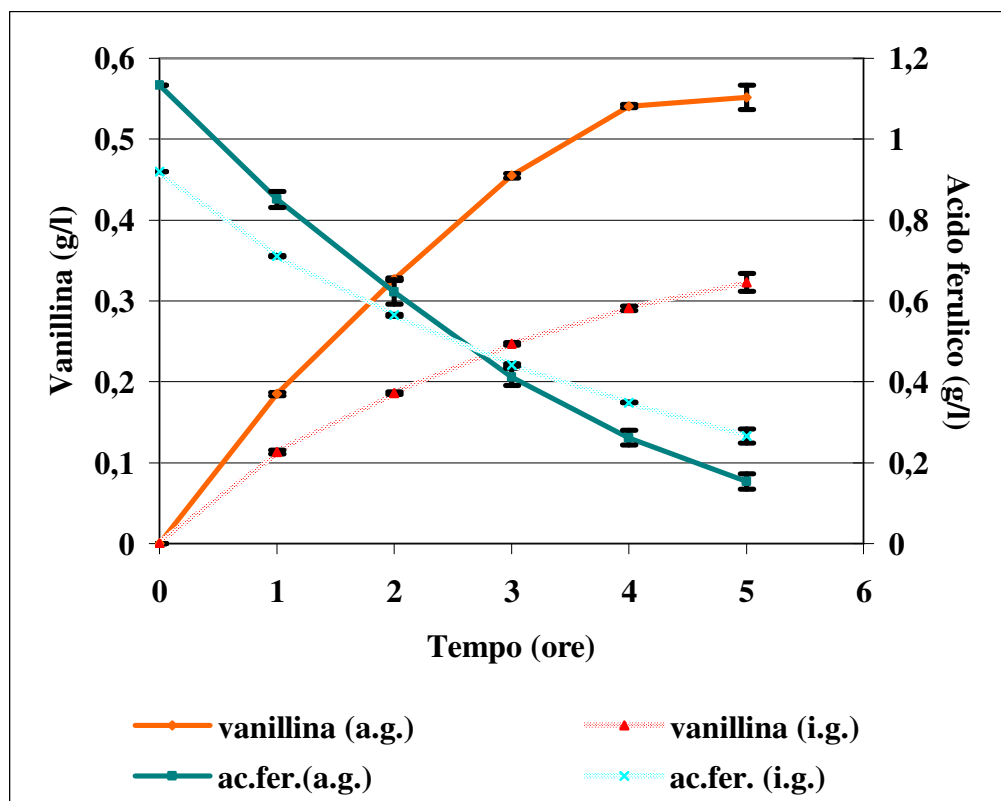
Insieme al substrato (l'acido ferulico), uno degli elementi che possono incidere maggiormente sui costi complessivi del processo è il costo degli ingredienti utilizzati per preparare il terreno di coltura. L'utilizzo di un terreno costituito da componenti di grado analitico (*Analytical grade*, a.g.) sarebbe improponibile a livello industriale, in quanto il solo triptone, uno dei principali costituenti del terreno LB, ha un costo che si aggira intorno ai 100 €/kg. E' stata quindi valutata la possibilità di utilizzare per il terreno di crescita ingredienti di grado industriale (*Industrial grade*, i.g.), con minor grado di purezza, ma con costo contenuto: 22 €/kg nel caso del triptone.

In particolare, è stato determinato l'effetto che ingredienti meno puri possono avere sulla produzione di biomassa e sulla capacità delle cellule di convertire efficientemente l'acido ferulico in vanillina.

Il ceppo è stato cresciuto in parallelo su terreno LB di grado analitico (a.g) e di grado industriale (i.g), aggiungendo in entrambi i casi acido ferulico come induttore (0,05% w/v).

Dopo 4 ore di crescita, le due colture avevano raggiunto una assorbanza comparabile, ($OD_{600}=1,4$ in LB a.g. e in LB i.g), il che suggeriva che la produzione di biomassa non sembra essere influenzata negativamente dall'impiego di un terreno di coltura con più impurezze. La biomassa è stata successivamente recuperata ed utilizzata per prove di bioconversione.

Figura 22: Produzione di vanillina e consumo di acido ferulico con cellule provenienti da colture cresciute in terreno LB di grado analitico (a.g.) e di grado industriale (i.g.).



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 6 g (peso umido)/l di cellule resting e circa 1 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti.
(a.g. = crescita su terreno di grado analitico; i.g. = crescita su terreno di grado industriale).

I risultati mostrati nella Figura 22 indicano che, dopo 5 ore di bioconversione, la quantità di vanillina ottenuta con cellule cresciute in terreno preparato con ingredienti di grado industriale è inferiore a quella ottenuta con cellule cresciute in LB di grado analitico: $0,323 \pm 0,011$ g/l di vanillina contro i $0,552 \pm 0,015$ g/l.

Tuttavia la quantità di acido ferulico consumato ($0,980 \pm 0,003$ g/l di acido ferulico) da cellule cresciute in terreno di grado analitico è 1,5 volte superiore rispetto a quella utilizzata da cellule cresciute su terreno di grado industriale ($0,654 \pm 0,005$ g/l di acido ferulico).

Nelle due condizioni, vengono prodotti, rispettivamente, 0,56 (LB a.g.) e 0,49 (LB i.g.) grammi di vanillina per grammo di acido ferulico consumato.

Una riduzione del 15% nella quantità di vanillina prodotta è ampiamente compensata dal costo del terreno di coltura che si riduce di circa 16 volte (3,72 €/l per il terreno LB di grado analitico contro 0,263 €/l per quello di grado industriale).

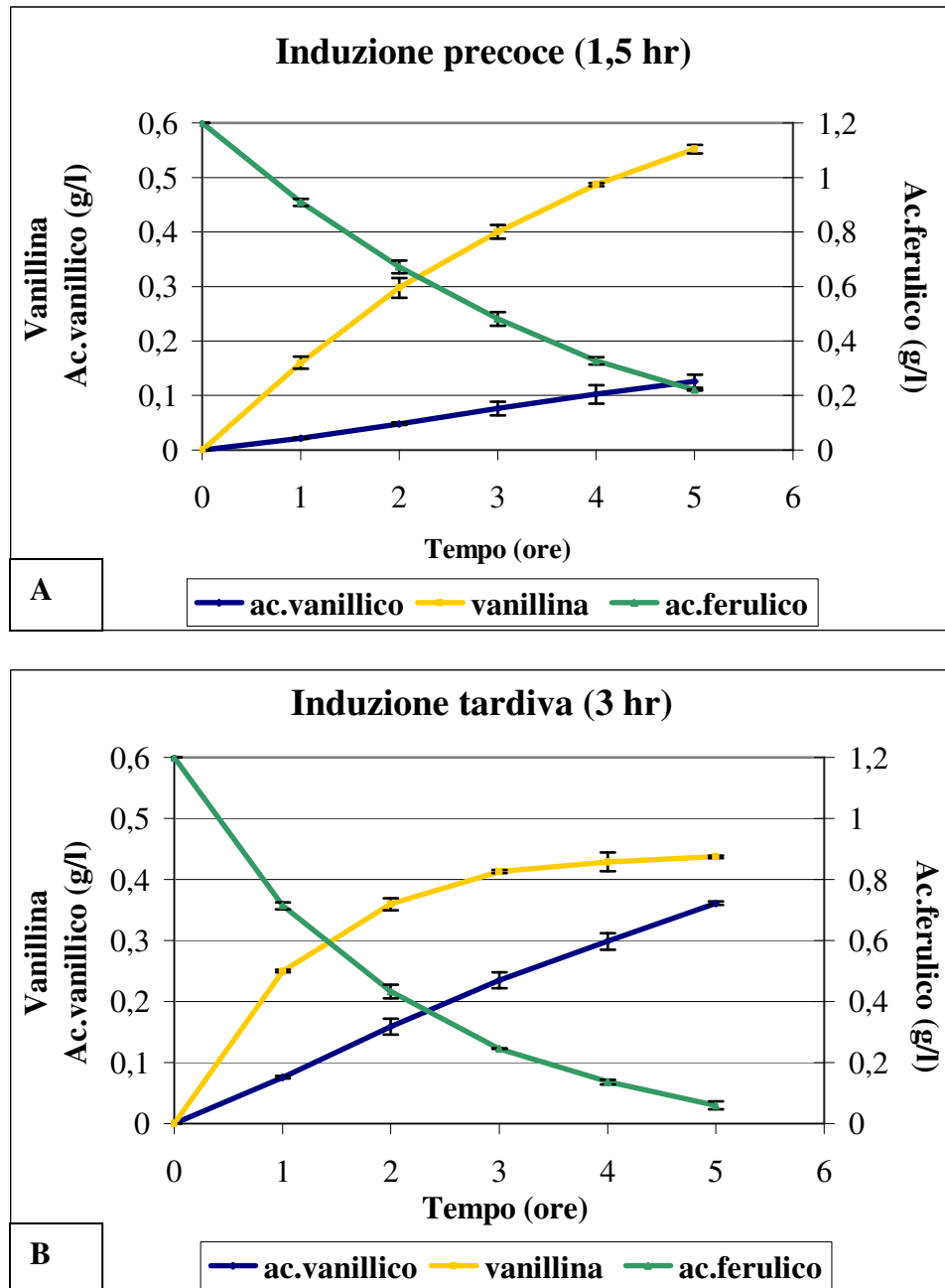
In conclusione la crescita della biomassa da utilizzare per la produzione di vanillina può essere condotta impiegando terreno LB preparato con costituenti a basso costo.

4.1.3 Modalità di induzione

Nelle prove appena descritte, per stimolare la produzione degli enzimi responsabili della conversione dell'acido ferulico in vanillina, al momento dell'inoculo, veniva aggiunto acido ferulico al terreno di crescita. Avendo, però, constatato che un tempo di induzione prolungato stimolava la produzione di enzimi in grado di ossidare la vanillina, si è pensato di ridurre il tempo di induzione ad 1 ora.

Le prove sono state condotte come descritto in precedenza, utilizzando terreno LB di grado industriale come mezzo di coltura. L'acido ferulico (0,05% w/v) è stato aggiunto alle colture 1,5 e 3 ore dopo l'inoculo e l'induzione, in entrambi i casi, è stata protratta per 1 ora prima di raccogliere le cellule da utilizzare nelle prove di bioconversione.

Figura 23: Produzione di vanillina ed acido vanillico e consumo di acido ferulico con cellule esposte all'acido ferulico 1,5 ore (A) e 3 ore (B) dopo l'inoculo.



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 6 g (peso umido)/l di cellule resting e circa 1,2 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti.

Come mostrato nella Figura 23, dopo 5 ore di bioconversione, la quantità di vanillina più elevata ($0,552 \pm 0,009$ g/l) è prodotta aggiungendo l'induttore 1,5 ore dopo l'inoculo. La massima quantità di vanillina prodotta, con cellule indotte dopo 3 ore di crescita, invece, è di $0,437 \pm 0,006$ g/l. In questa condizione, a partire dalla seconda ora di bioconversione, si osserva un decremento nella produzione di vanillina dovuto ad una rapida ossidazione del prodotto ad acido vanillico. Utilizzando per la bioconversione cellule indotte 1,5 ore dall'inoculo, prelevate dopo 1 ora di induzione, si ottiene una quantità di vanillina comparabile a quella ottenuta nelle prove condotte in terreno LB di grado analitico (Figura 22).

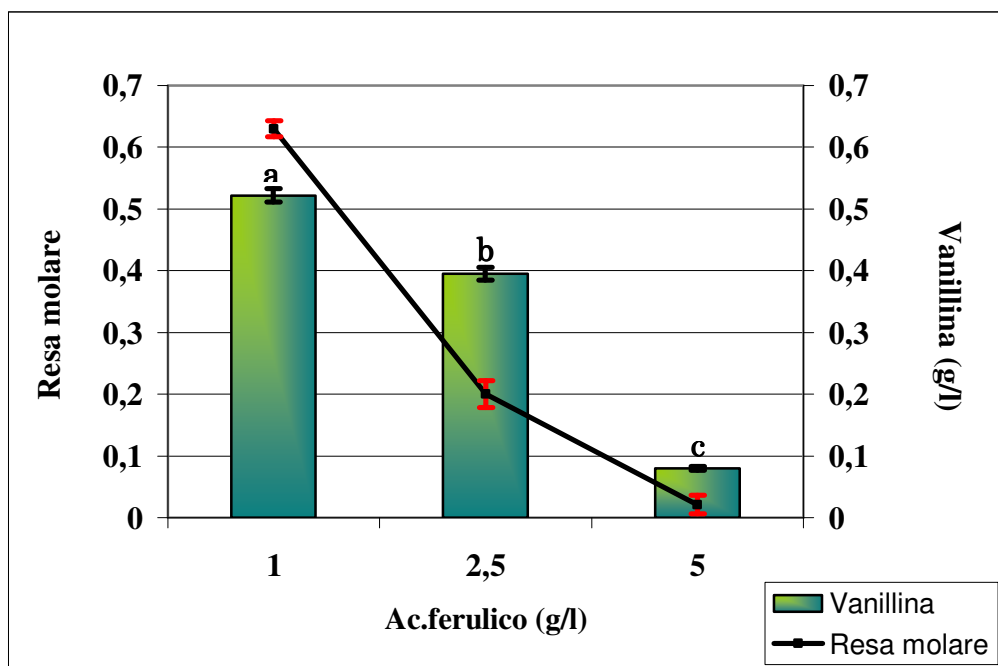
4.2 Ottimizzazione delle condizioni di bioconversione

4.2.1 Concentrazione ottimale di acido ferulico nel tampone di bioconversione

Per determinare la concentrazione ottimale di acido ferulico da utilizzare nella bioconversione sono state allestite prove con cellule provenienti da colture in fase esponenziale cresciute su terreno LB di grado industriale.

La coltura è stata preparata come nell'esperimento precedente, aggiungendo l'induttore 1,5 ore dopo l'inoculo, mentre le prove di bioconversione sono state condotte con quantità variabili di acido ferulico: 1-5 g/l.

Figura 24: Resa molare e quantità di vanillina prodotta utilizzando quantità crescenti di acido ferulico.



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 6 g (peso umido)/l di cellule resting e le quantità indicate di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti. Le medie in colonna seguite dallo stesso esponente non erano significativamente diverse dal test Tukey ($P < 0,05$).

Come mostrato nella Figura 24 la quantità di acido ferulico trattata influenza in modo significativo l'efficienza catalitica del microrganismo. Dopo 5 ore di bioconversione, la quantità più elevata di vanillina, $0,522 \pm 0,011$ g/l, si ottiene utilizzando soluzioni diluite di substrato (1 g/l di acido ferulico), con una resa molare in vanillina di 0,63 (moli di vanillina prodotte/moli di acido ferulico consumate). Aumentando la quantità di acido ferulico trattato a 5 g/l si osserva una produzione di vanillina sensibilmente più bassa ($0,080 \pm 0,003$ g/l) e una diminuzione del 98% nella resa molare.

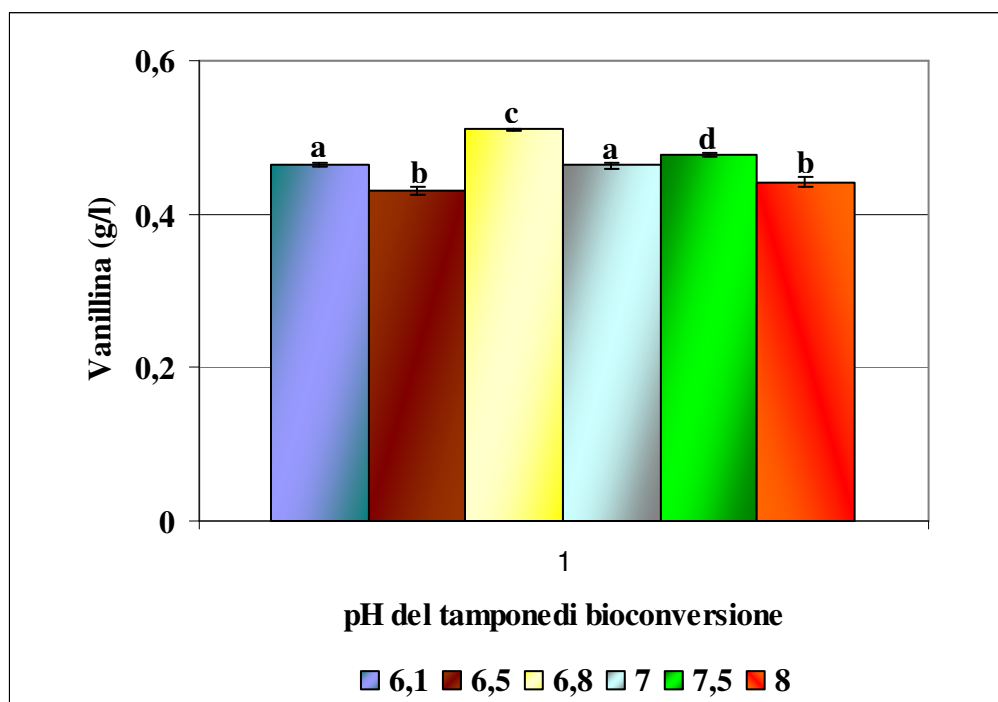
Questi andamenti sembrano suggerire che alte concentrazioni di acido ferulico possono esercitare un effetto tossico sulle cellule, il che ha effetti negativi sull'efficienza catalitica del microrganismo.

4.2.2 Effetto del pH del mezzo di bioconversione sulla produzione di vanillina

Lo scopo di questa prova è stato quello di verificare l'effetto del pH del tampone di bioconversione sulla produzione di vanillina.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando cellule cresciute come descritto in precedenza: (induzione con acido ferulico 1,5 ore dopo l'inoculo e recupero delle cellule un ora dopo l'aggiunta dell'induttore) e la biomassa è stata risospesa in tampone fosfato salino a pH compreso tra 6,1 e 8,0.

Figura 25: Vanillina prodotta a diversi pH in tamponi di bioconversione.



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 6 g (peso umido)/l di cellule resting e 1 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti. Le medie in colonna seguite dallo stesso esponente non erano significativamente diverse dal test Tukey ($P < 0,05$).

I risultati ottenuti, dopo 3 ore di bioconversione (Figura 25), mostrano che il pH del tampone di bioconversione sembra avere una influenza limitata sulla trasformazione dell'acido ferulico in vanillina.

L'utilizzo per la bioconversione di un tampone fosfato a pH 6,8 consente di ottenere una quantità di vanillina lievemente più elevata ($0,5110 \pm 0,0016$ g/l), quindi le successive prove in bioreattore sono state condotte utilizzando un tampone a pH 6,8.

Prove in bioreattore

4.3 Ottimizzazione della produzione della biomassa

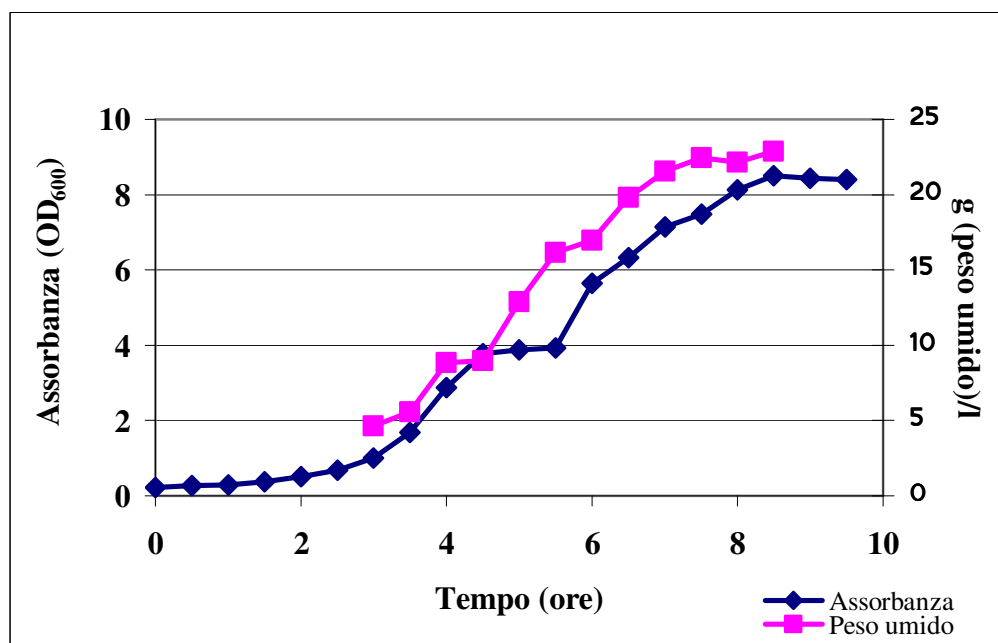
Dopo aver individuato le condizioni per la produzione, in beuta, della biomassa, sono state condotte sperimentazioni in fermentatore da banco da 2 e 15 L, per verificare la riproducibilità dei risultati ottenuti e ottimizzare ulteriormente il processo.

4.3.1 Crescita in bioreattore da 2 L

Per la crescita della biomassa, cellule di *P. fluorescens* BF13-1p4(pBB1) sono state coltivate in un fermentatore da 2 L (Applikon) contenente 1 L di terreno LB di grado industriale, come descritto in Materiali e Metodi (Tabella 7, Sezione 2.8).

Ogni 30 minuti sono stati effettuati prelievi per la determinazione della produzione della biomassa che è stata effettuata mediante letture spettrofotometriche (OD_{600}) e misurazione del peso umido (Figura 26).

Figura 26: Crescita di BF13 1-p4(pBB1) in fermentatore da 2 L.



I risultati ottenuti (Figura 26) evidenziano che il ceppo BF13-1p4(pBB1) presenta una curva di crescita diauxica quando viene coltivato in terreno LB. Questo risultato è probabilmente da attribuire ad un utilizzo sequenziale dei componenti del mezzo di coltura da parte del microrganismo.

Nelle condizioni esaminate, la fase di latenza dura circa 2,5 ore, la prima fase esponenziale 2 ore, così come la seconda. Dopo 8 ore di crescita la coltura entra in fase stazionaria, in queste condizioni l'OD₆₀₀ e la concentrazione di biomassa sono, rispettivamente, di 8,4 e 23 g di biomassa (peso umido)/l di coltura.

4.3.2 Induzione con acido ferulico

Avendo dimostrato, con le prove in beuta, che la durata della fase di induzione influisce in modo significativo sulla velocità di consumo dell'acido ferulico e sulla quantità di vanillina che viene successivamente ossidata ad acido vanillico, sono state allestite prove di bioconversione utilizzando cellule cresciute in presenza di acido ferulico per periodi compresi tra 1 e 3 ore (Tabella 10).

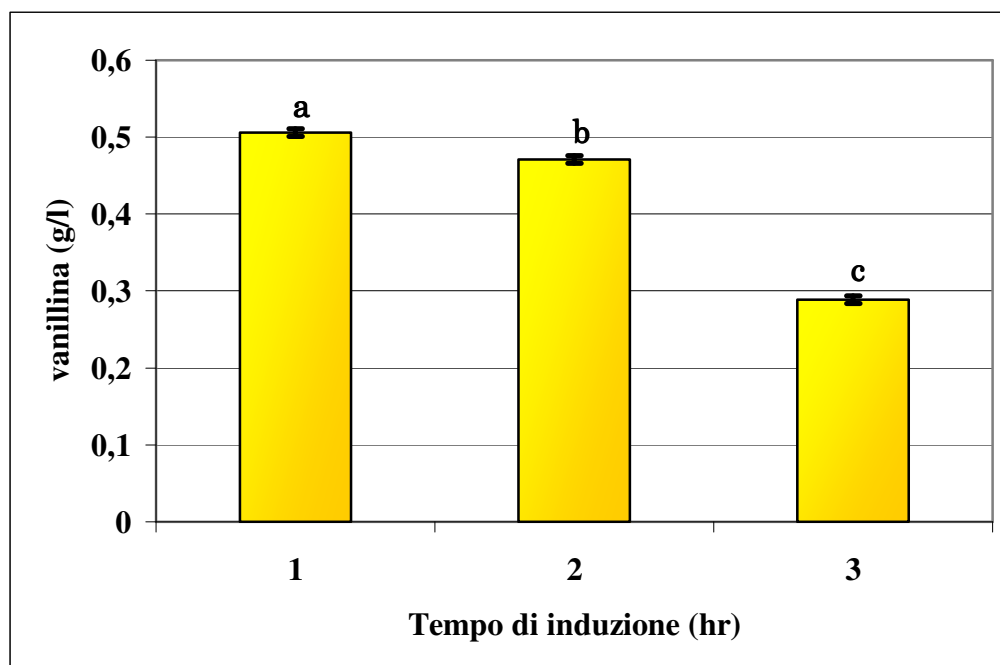
Le condizioni utilizzate per la crescita del microrganismo sono descritte in Materiali e Metodi (Tabella 7, sezione 2.8). L'acido ferulico (0,05% w/v) è stato aggiunto alla

coltura 1,5 ore dopo l'inoculo; al momento dell'aggiunta dell'induttore l'assorbanza della coltura (OD_{600}) era di circa 2,6.

Tabella 10: Assorbanza (OD_{600}) e peso umido (g/l) della coltura cresciuta in presenza di acido ferulico per 1-3 ore. L'acido ferulico (0,005% w/v) è stato aggiunto alla coltura 1,5 ore dopo l'inoculo ($OD_{600}=2,6$).

Induzione con acido ferulico (ore)	Assorbanza (OD_{600})	Peso umido (g/l)
1	3,87	7,4
2	4,83	8,7
3	6,6	11,0

Figura 27: Quantità di vanillina prodotta con cellule indotte per tempi variabili con acido ferulico.



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 6 g (peso umido)/l di cellule resting e 1 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti. Le medie in colonna seguite dallo stesso esponente non erano significativamente diverse dal test Tukey ($P<0,05$).

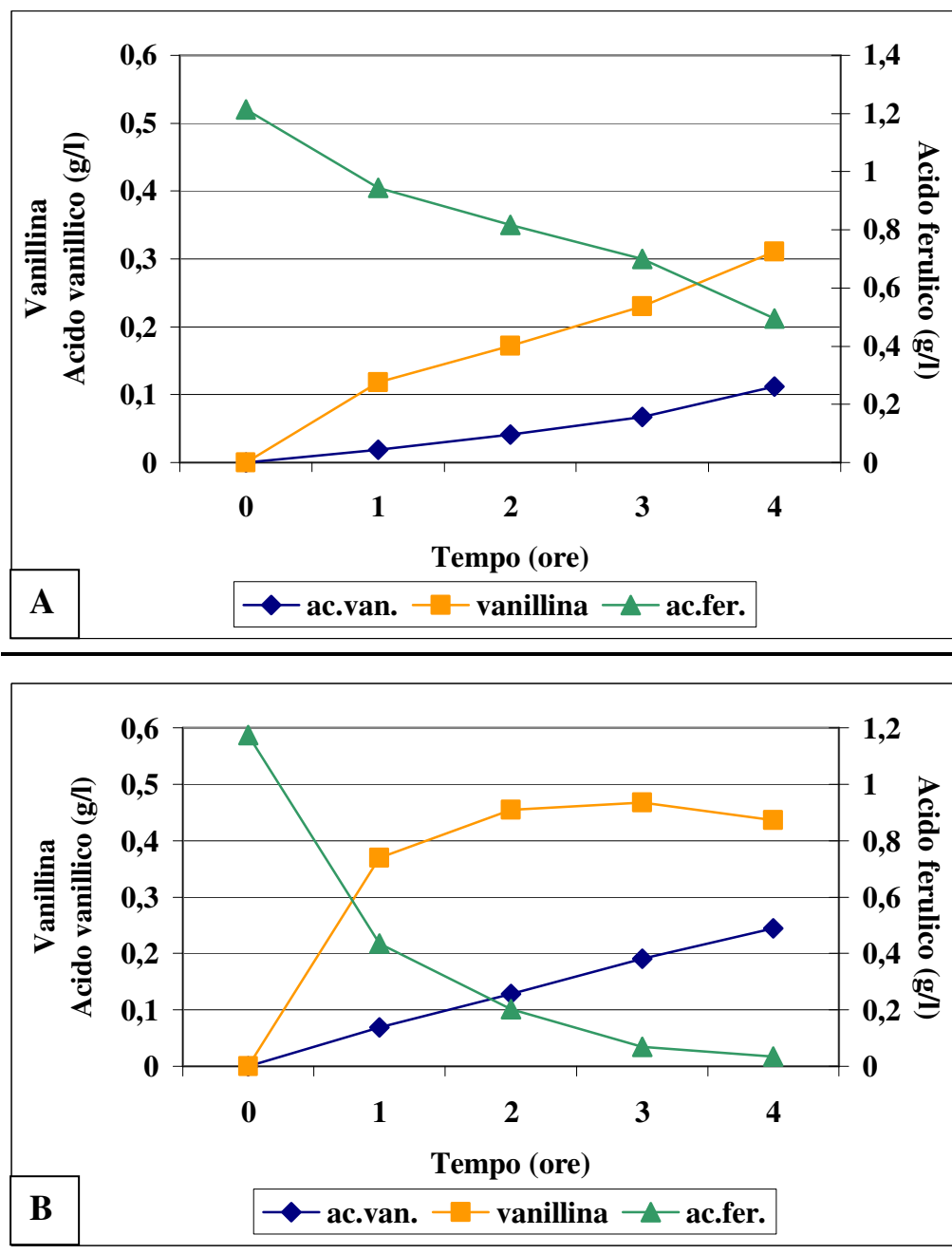
Dalla Figura 27 emerge che un' induzione prolungata (3 ore) con acido ferulico esercita un effetto negativo sull' accumulo di vanillina nel mezzo di bioconversione. La quantità di vanillina più elevata $0,506 \pm 0,005$ g/l viene ottenuta con cellule provenienti da colture esposte ad acido ferulico per 1 ora. In analogia a quanto visto nelle prove in beuta, un'esposizione prolungata al substrato sembra stimolare la produzione di enzimi in grado di ossidare la vanillina ad acido vanillico.

4.3.3 Influenza del pH del terreno di coltura sul processo di bioconversione

Per valutare l'effetto del pH del terreno di coltura sulla capacità delle cellule di convertire l'acido ferulico in vanillina, sono state effettuate prove di crescita a pH libero e a pH costante (6,8) nelle condizioni riportate in Materiali e Metodi (Tabella 7, sezione 2.8).

Le cellule sono state raccolte dopo 1 ora di induzione con acido ferulico ed utilizzate per allestire esperimenti di bioconversione nelle condizioni descritte nella Figura 28.

Figura 28: Produzione di vanillina e consumo di acido ferulico con cellule cresciute in condizioni di pH controllato (A) o a pH libero (B).



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 6 g (peso umido)/l di cellule resting e 1,2 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti.

Dall'analisi dei dati relativi alle bioconversioni, appare evidente che il pH, del mezzo di coltura, influenza la capacità del microrganismo di convertire l'acido ferulico in vanillina (Figura 28).

Cellule cresciute in terreno LB, a pH costante (6,8; Figura 28A), degradano più lentamente l'acido ferulico rispetto a cellule cresciute a pH libero. Il tasso di consumo del substrato, dopo la prima ora di bioconversione, passa da 123 mg di acido ferulico per g di biomassa (pH libero; Figura 28B) a 45 mg per g di biomassa (pH controllato; Figura 28A).

Quando il microrganismo viene coltivato a pH libero, dopo 4 ore di processo, l'acido ferulico è completamente esaurito, mentre a pH controllato circa il 41% del substrato fornito non viene consumato.

L'elevato consumo di acido ferulico consente di incrementare del 52% la quantità massima di vanillina prodotta (0,47 g/l con cellule cresciute a pH libero e 0,31 g/l con cellule cresciute a pH controllato).

La quantità di acido vanillico prodotto dopo 4 ore di bioconversione nella condizione pH libero è 2,2 volte superiore a quella prodotta crescendo il microrganismo in terreno a pH costante.

4.4 Ottimizzazione dei parametri di bioconversione

4.4.1 Aggiunta di fattori nutrizionali al tampone di bioconversione

Tenendo conto del fatto che l'attivazione del substrato a feruloil-CoA dipende dalla disponibilità del cofattore, in una serie successiva di prove è stato valutato l'effetto dell'aggiunta di fattori nutrizionali, al tampone di bioconversione, sulla velocità di consumo dell'acido ferulico e sulla quantità massima di vanillina prodotta.

Studi precedenti condotti con BF13-97, un mutante incapace di convertire l'acido vanillico in acido protocatechico, avevano permesso di dimostrare che, la presenza nel tampone di bioconversione, di piccole quantità di estratto di lievito (0,001% w/v) stimolava, in modo significativo, la conversione dell'acido ferulico in acido vanillico (Civolani *et al.*, 2000). E' stato quindi valutato se l'aggiunta di estratto di lievito o estratto di malto, al tampone di bioconversione, potesse favorire l'accumulo di

vanillina utilizzando cellule di BF13-1p4(pBB1) coltivate nelle condizioni descritte in precedenza.

Questi esperimenti sono stati condotti emendando il mezzo di bioconversione con estratto di lievito o estratto di malto alla concentrazione di 0,005% (w/v).

Le cellule sono state cresciute in bioreattore in LB di grado industriale a pH libero secondo le condizioni riportate in Materiali e Metodi (Tabella 7, Sezione 2.8).

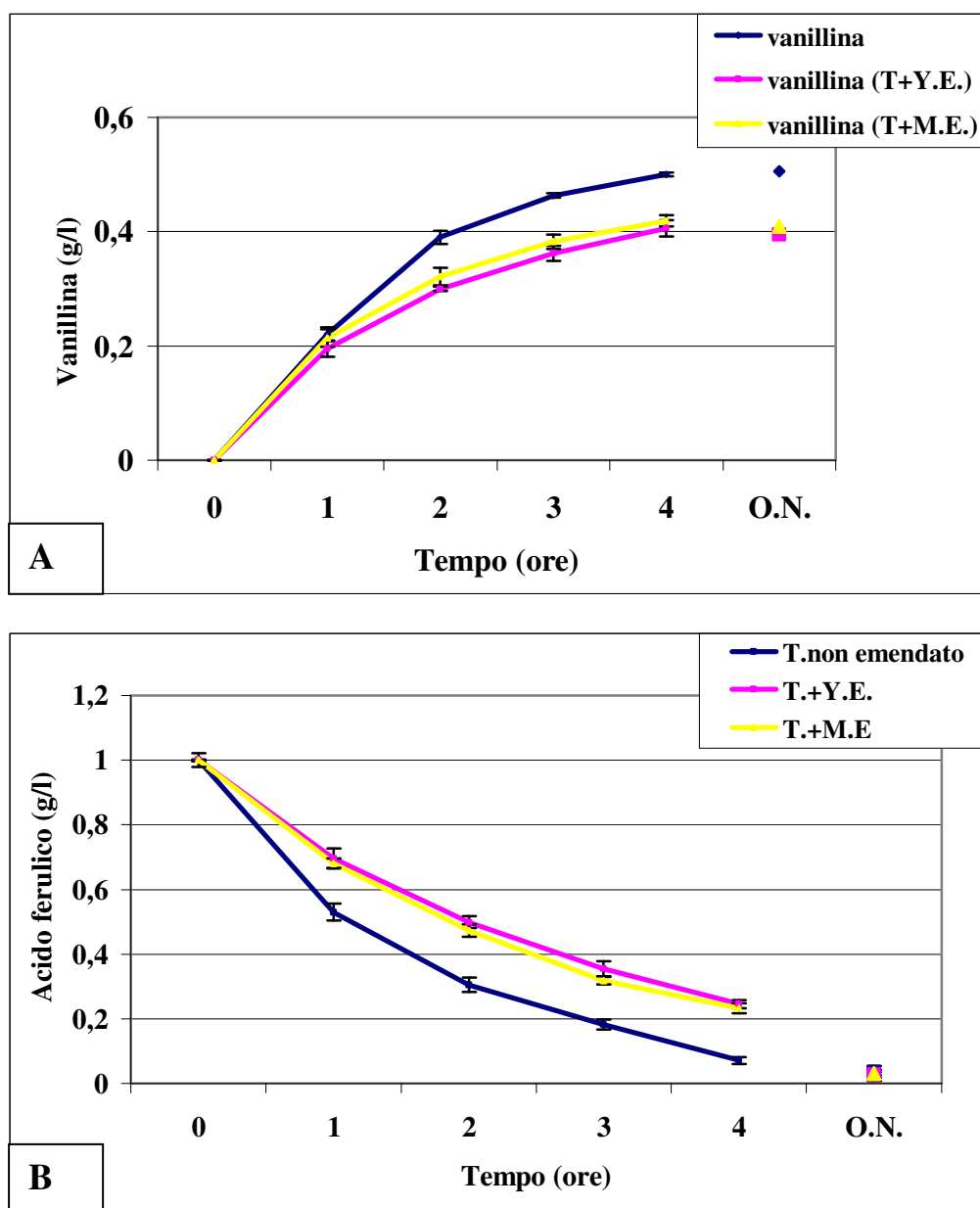
Dopo 1,5 ore di crescita (OD_{600} 2,9) è stato aggiunto acido ferulico di grado industriale alla concentrazione finale dello 0,05% (w/v) e dopo 1 ora di induzione (OD_{600} 3,7) la biomassa è stata recuperata per prove di bioconversione.

Come mostrato nella figura 29A, l'aggiunta di fattori nutrizionali al tampone di bioconversione in forma di estratto di lievito (linea rosa) o estratto di malto (linea gialla), non determina alcun incremento sulla velocità di consumo dell'acido ferulico.

La quantità massima di vanillina prodotta, dopo 16 ore di incubazione, risulta in entrambi i casi ($0,447 \text{ g/l} \pm 0,0017$ con tampone emendato con estratto di lievito e $0,463 \text{ g/l} \pm 0,002$ con tampone emendato con estratto di malto; Figura 29A), inferiore a quella ottenuta con il tampone non emendato ($0,506 \text{ g/l} \pm 0,003$; Figura 29B).

Si può pertanto concludere che l'aggiunta di fattori nutrizionali non esercita alcun effetto positivo sulla produzione di vanillina e che, quindi, non è utile emendare il tampone di bioconversione per la presente applicazione. Poiché l'aggiunta di fattori nutrizionali non comporta un effetto sulla produzione di vanillina, le prove successive sono state condotte senza effettuare modifiche del tampone di bioconversione.

Figura 29: Produzione di vanillina (A) e consumo di acido ferulico (B) utilizzando un tampone di bioconversione non emendato o emendato con estratto di lievito o estratto di malto.



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 6 g (peso umido)/l di cellule resting e 1 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti.

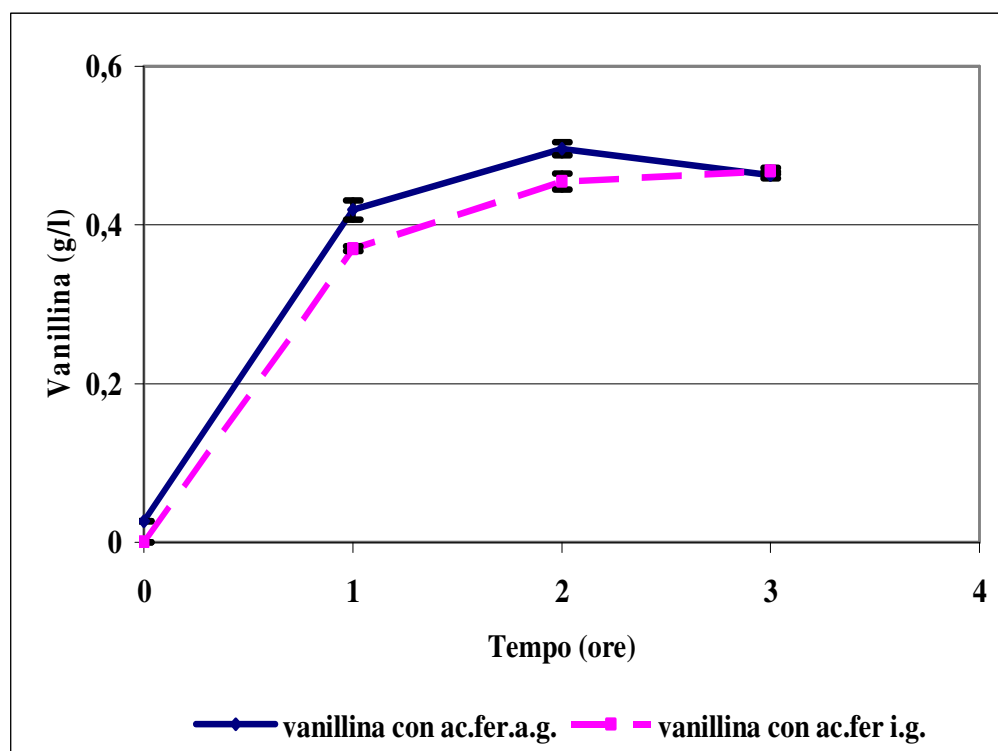
T.non emendato = tampone non emendato; T+Y.E. = tampone emendato con estratto di lievito; T+M.E. = tampone emendato con estratto di malto.

4.4.2 Influenza del grado di purezza del substrato sulla produzione di vanillina.

Per contenere ulteriormente i costi del processo è stata anche verificata la possibilità di utilizzare acido ferulico di grado industriale come induttore e come substrato di bioconversione.

Le cellule sono state cresciute in bioreattore secondo le modalità descritte in precedenza (pH libero ed induzione precoce limitata ad un ora con acido ferulico).

Figura 30: Produzione di vanillina utilizzando acido ferulico di grado analitico o industriale.



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 6 g (peso umido)/l di cellule resting e 1 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti.
a.g = acido ferulico di grado analitico; i.g. = acido ferulico di grado industriale.

I risultati ottenuti nelle prove di bioconversione (Figura 30) indicano che, l'utilizzo di acido ferulico di grado industriale non esercita un effetto negativo sulla produzione di aldeide vanillica. Dopo 3 ore di processo, in entrambe le condizioni esaminate, l'acido ferulico è quasi totalmente esaurito; la quantità di substrato residuo è, rispettivamente di $0,014 \pm 0,030$ g/l con il prodotto di grado analitico e $0,040 \pm 0,018$ g/l, con quello di grado industriale. Un dato interessante di queste prove è che la quantità di vanillina prodotta a partire da acido ferulico industriale ($0,468$ g/l $\pm 0,004$) è comparabile a quella ottenuta con acido ferulico analitico ($0,463$ g/l $\pm 0,042$).

L'utilizzo di acido ferulico di grado non analitico non ha quindi effetti negativi sul processo di bioconversione e, al contempo, permette di contenere i costi (230 €/Kg per l'acido ferulico di grado analitico e 33,33 €/Kg per quello di grado industriale).

Le prove successive sono state quindi condotte utilizzando il substrato di grado industriale.

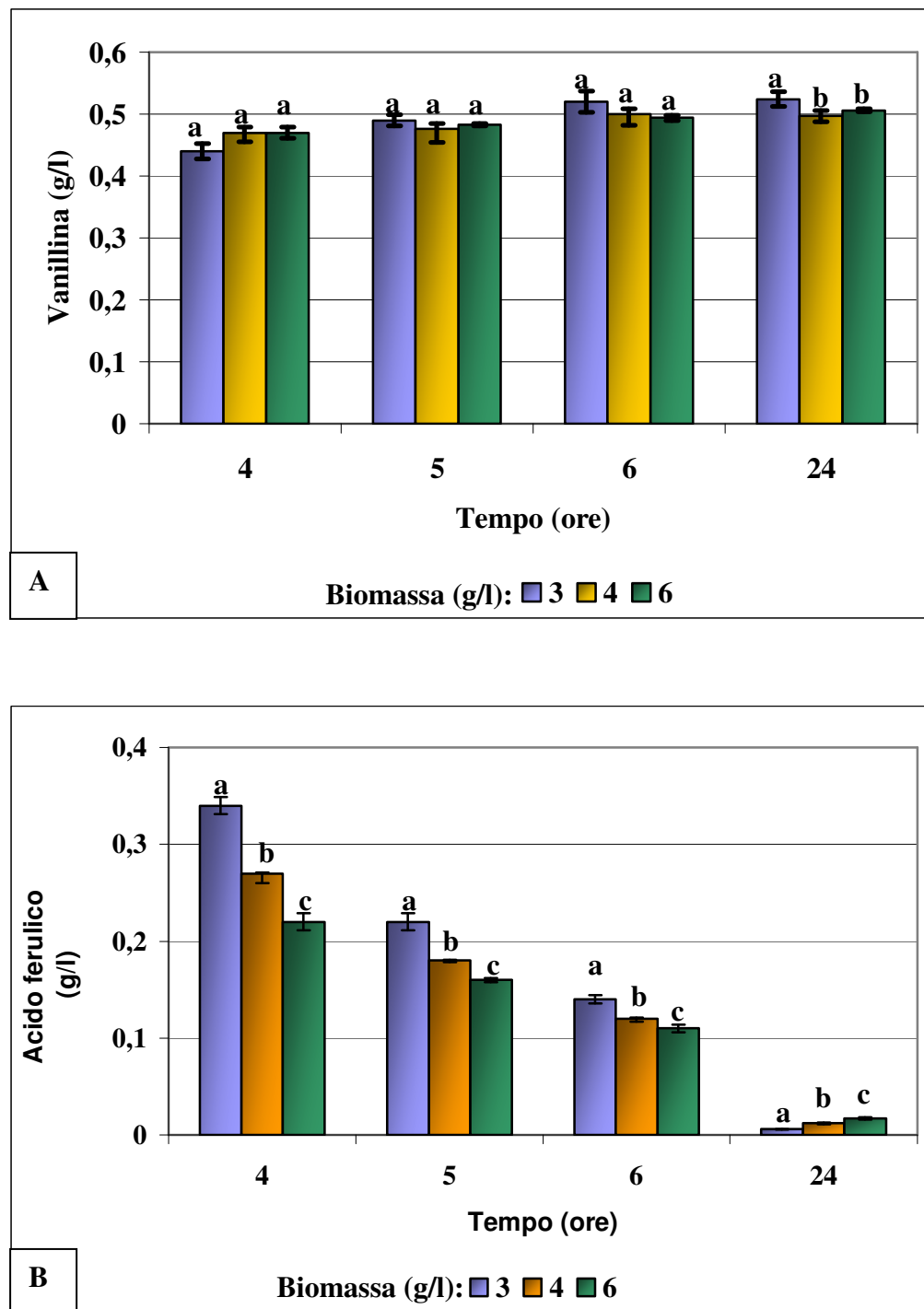
4.4.3 Effetto della quantità di biomassa sulla produzione di vanillina

Dal momento che la produzione di biomassa, ed in particolare del terreno utilizzato, influisce in modo significativo sull'economicità di questo processo, è stata valutata la possibilità di produrre vanillina utilizzando quantità di cellule inferiori ai 6 g (peso umido)/l.

Le cellule sono state cresciute nelle condizioni descritte in precedenza, mentre le bioconversioni sono state effettuate utilizzando 1 g/l di acido ferulico e quantità variabili di biomassa, compresa tra 3 e 6 g (peso umido)/l.

Nella Figura 31 viene riportato la quantità di vanillina prodotta (A) e di acido ferulico residuo (B).

Figura 31: Produzione di vanillina (A) e acido ferulico residuo (B) utilizzando concentrazioni variabili di biomassa



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con quantità di biomassa compresa tra 3 e 6 g (peso umido)/l e 1 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti. Le medie in colonna seguite dallo stesso esponente non erano significativamente diverse dal test Tukey ($P < 0,05$).

Come mostrato nella Figura 31A, nelle prime 6 ore di bioconversione, la quantità di vanillina prodotta non è influenzata in modo significativo dalla quantità di cellule utilizzate per la bioconversione, tuttavia utilizzando quantità più elevate di biomassa si ha un consumo maggiore di acido ferulico (Figura 31B).

Dopo 24 ore di bioconversione utilizzando 4 e 6 g (peso umido) /l di biomassa, la quantità di vanillina prodotta è rispettivamente di $0,497 \pm 0,009$ e $0,506 \pm 0,002$ g/l, con 3 g (peso umido) /l di biomassa si ottengono $0,524 \pm 0,012$ g/l di vanillina.

La resa molare (moli di vanillina prodotte/moli di acido ferulico consumate), dopo 24 ore di bioconversione, utilizzando 3 g (peso umido)/l di biomassa è di 0,61 contro i 0,59 ottenuti con concentrazioni più elevate di cellule.

Sulla base dei risultati presentati è possibile concludere che l'impiego di quantità elevate di biomassa non permette di incrementare la produzione di vanillina e quindi non è consigliabile per l'ecomonicità del processo.

4.5 Scale up del processo di produzione della biomassa in fermentatore da 15 L

E' stato anche effettuato uno scale up della produzione di biomassa per verificare la robustezza dei risultati ottenuti, utilizzando le apparecchiature disponibili presso il laboratorio di ricerca e sviluppo della Gnosis s.p.a di Desio (MI).

La crescita microbica è stata effettuata in fermentatore da 15 L (con 10 L di terreno) utilizzando LB di grado industriale.

La crescita in fermentatore è stata effettuata nelle condizioni riportate nella Tabella 11.

Tabella 11: Parametri e condizioni della crescita di biomassa in fermentatore.

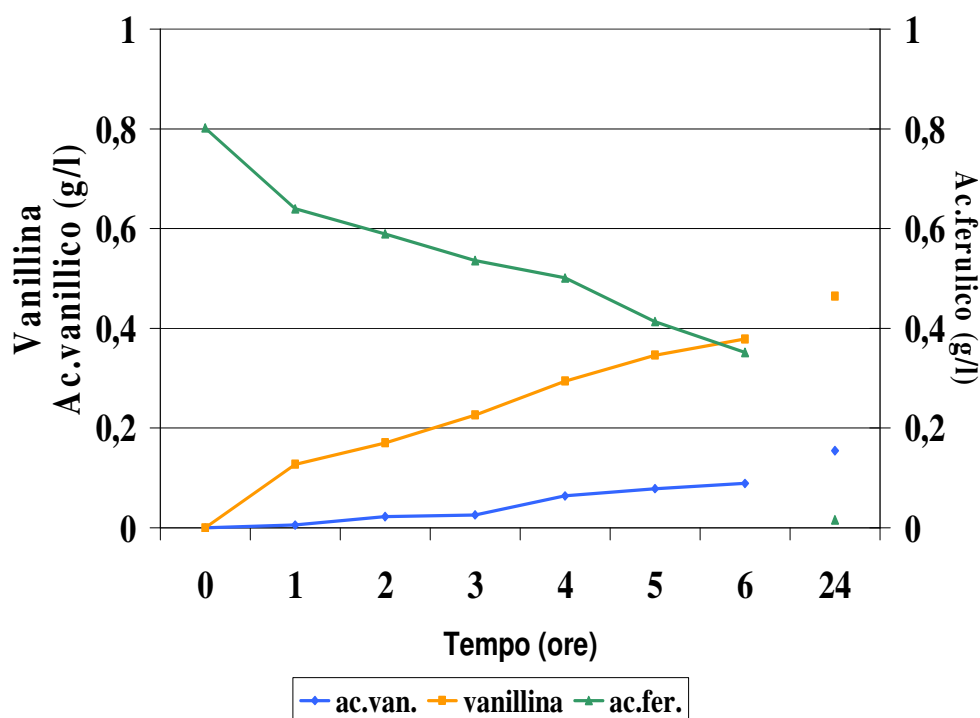
Terreno di crescita	LB
Volume di terreno	10 L
OD₆₀₀ iniziale	0,3
Temperatura	30°C
[O₂]_i	30% di saturazione
Agitazione	200-350 rpm
Flusso Aria	1,2 v/v/m
pH iniziale	7,2
Induzione con acido ferulico	500 mg/L
OD₆₀₀ iniziale/tempo	0,73/1hr
Densità cellulare finale	OD ₆₀₀ =1,7 4,15 g (peso umido)/l

Il fermentatore è stato inoculato con cellule provenienti da una coltura overnight in terreno LB in modo da avere un OD₆₀₀ iniziale di 0,3. Quando la coltura ha raggiunto una assorbanza di 0,7 (2 ore circa dopo l'inoculo) è stato aggiunto acido ferulico (0,05% w/v) e la coltura è stata mantenuta in crescita, in presenza dell'induttore, per un'ora.

Al momento del recupero della biomassa l'OD₆₀₀ della coltura era 1,7 con un peso umido di 4,15 g/l.

La prova di bioconversione sono state condotte con 3 g (peso umido)/l di biomassa ed 0,8 g/l di acido ferulico.

Figura 33: Produzione di vanillina ed acido vanillico e consumo di acido ferulico con cellule cresciute in fermentatore da 15 L.



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 3 g (peso umido)/l di cellule resting e 0,8 g/l di acido ferulico

I risultati mostrati nella Figura 33 indicano che le cellule cresciute in fermentatore da 15 L producono una quantità di vanillina (0,47 g/l) dopo 24 ore di bioconversione, comparabile con quella ottenuta coltivando il microrganismo in reattore da 2 L ($0,506 \pm 0,012$ g/l; Figura 31). Sulla base dei risultati ottenuti è possibile concludere che, cellule resting del ceppo BF13-1p4(pBB1) possono essere utilizzate per la produzione di vanillina da acido ferulico utilizzando materie prime di grado industriale e condizioni che possono essere trasferite su scala pilota o industriale.

4.6 Utilizzo di terreni alternativi per la produzione della biomassa

In un'altra serie di prove è stata valutata la possibilità di produrre biomassa utilizzando un terreno alternativo al terreno LB e di costo inferiore. Il ceppo BF13-1p4(pBB1) è stato coltivato su terreno salino M9 contenente glucosio o sodio succinato come fonte di carbonio. La crescita del microrganismo è stata effettuata in beuta e le bioconversioni sono state fatte con cellule provenienti da colture in fase esponenziale (2 ore dopo l'inoculo) o in fase stazionaria (24 ore di crescita; Tabella 12), utilizzando 3 g (peso umido) di biomassa ed 1 g/l di acido ferulico (Figura 34).

In seguito sono state effettuate prove di bioconversione per valutare l'effetto, sulla capacità catalitica del microrganismo, di aggiunte sequenziali di acido ferulico, al tampone di bioconversione ed è stata messa a punto una procedura per la conservazione del biocatalizzatore microbico.

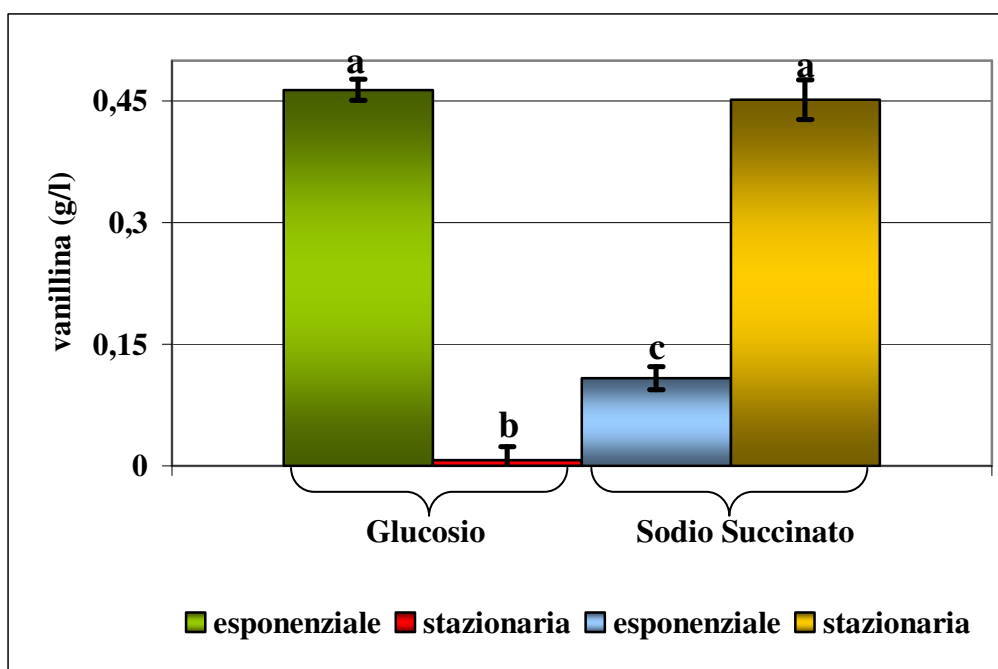
Tabella 12: Crescita di BF13-1p4(pBB1) su glucosio o sodio succinato.

Fonte di carbonio	Assorbanza (OD₆₀₀)		Peso umido (g/l)	
	2 ore	24 ore	2 ore	24 ore
Glucosio 0,5 %	2,08 ± 0,02	5,93 ± 0,01	2,70 ± 0,02	6,10 ± 0,08
Succinato 0,1 %	0,28 ± 0,05	1,50 ± 0,04	0,51 ± 0,03	4,50 ± 0,06

I risultati ottenuti nelle prove di bioconversione (Figura 34) indicano che la fase di accrescimento della coltura che è più adatta per la produzione di vanillina dipende dalla fonte di carbonio utilizzata per la coltivazione del microrganismo.

Figura 34: Vanillina prodotta con cellule cresciute in terreno salino M9 contenete glucosio (0,5% w/v) o sodio succinato (0,1% w/v) come fonte di carbonio.

Le prove di bioconversione sono state effettuate utilizzando cellule derivanti da colture in crescita esponenziale ed in fase stazionaria.



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 3 g (peso umido)/l di cellule resting e 1 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti. Le medie in colonna seguite dallo stesso esponente non erano significativamente diverse dal test Tukey ($P < 0,05$).

Come mostrato nella Figura 34, la quantità più elevata di vanillina è stata ottenuta con cellule provenienti da colture in fase esponenziale di crescita ($0,464 \pm 0,013$ g/l) con glucosio, ed in fase stazionaria con sodio succinato ($0,452 \pm 0,024$ g/l). Considerando che la produzione di biomassa, per litro di terreno, è maggiore utilizzando colture in fase stazionaria (Tabella 12), per le prove successive il microrganismo è stato coltivato in terreno contenete sodio succinato come fonte di carbonio.

4.6.1 Effetto di aggiunte sequenziali di acido ferulico sulla produzione di vanillina

Come mostrato in precedenza (Figura 24), la concentrazione iniziale di acido ferulico nel tampone di bioconversione influisce in modo significativo sulla produzione di vanillina, determinando una drastica riduzione nella quantità di vanillina prodotta che, a sua volta, dipende dalla quantità di acido ferulico fornito al microrganismo.

Per ottenere una maggiore quantità di vanillina, sono state quindi allestite prove di bioconversione nelle quali l'acido ferulico è stato aggiunto al tampone di bioconversione in aliquote sequenziali.

Le prove sono state condotte, con cellule provenienti da colture in fase stazionaria, cresciute in terreno salino M9 con sodio succinato, a concentrazione rispettivamente di 0,1% (w/v) e 0,6% (w/v; Tabella 13).

Nelle bioconversioni sono stati forniti al microrganismo rispettivamente 2,5 e 2,3 g/l di acido ferulico mediante 2 o 4 aggiunte di substrato. (Tabella 14).

Nella Tabella 14 viene riportata:

- La quantità di acido ferulico fornito,
- La quantità di acido ferulico residuo e consumato dopo 24 ore di bioconversione,
- La quantità di vanillina, e la resa molare (moli di vanillina prodotte/moli di acido ferulico consumate) dopo 24 ore di bioconversione.

Nella Figura 35 vengono mostrati i risultati della bioconversione.

Tabella 13: Terreno utilizzato per la crescita microbica; vengono inoltre riportati i valori di assorbanza e peso umido delle colture dopo 24 ore di crescita.

Terreno	Assorbanza (OD₆₀₀)	Biomassa Peso umido (g/l)
M9-Succinato (0,1%)	1,53	4,50
M9-Succinato (0,6%)	3,87	8,65

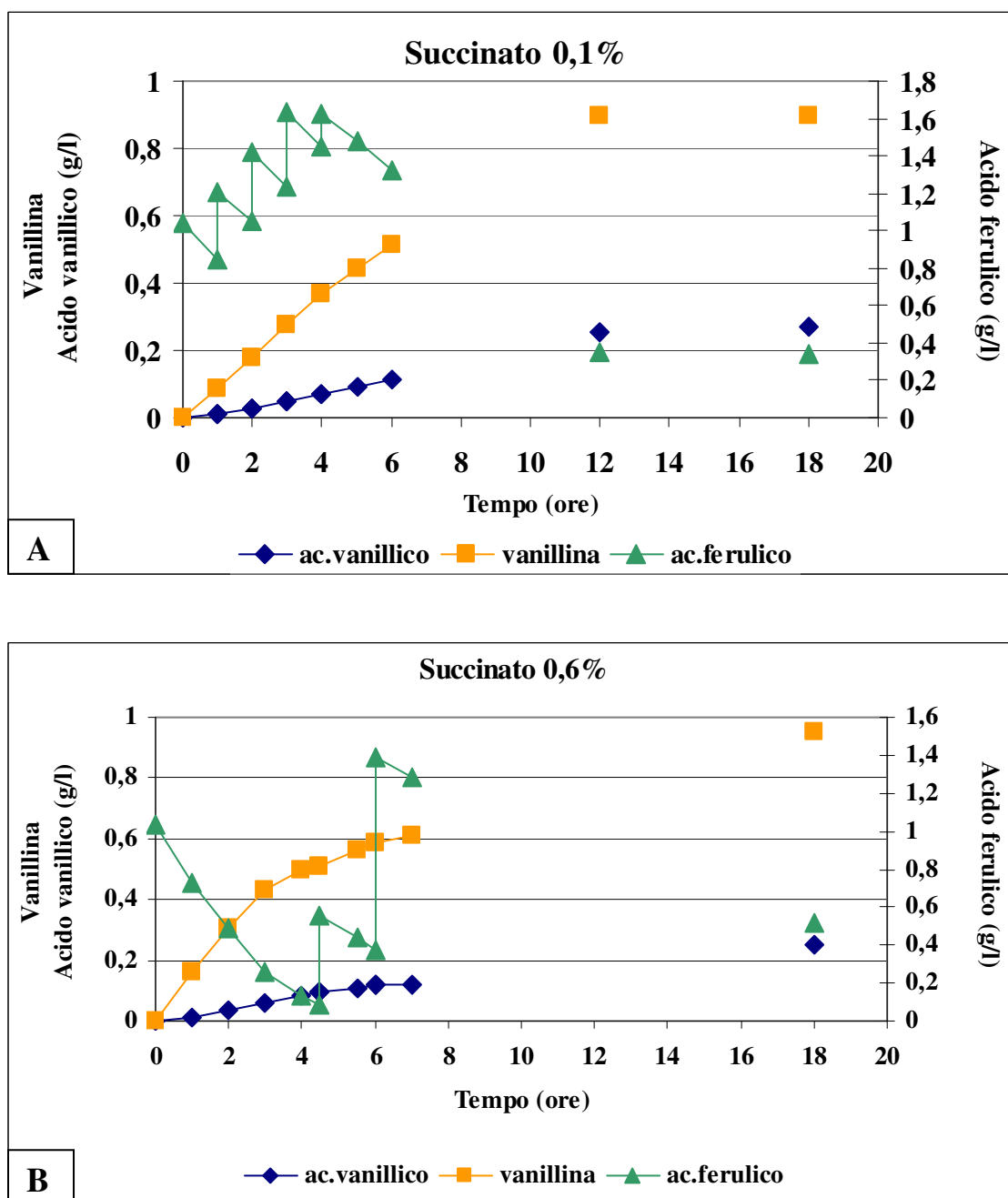
Tabella 14: Acido ferulico consumato e vanillina prodotta in prove di bioconversione effettuate con aggiunte sequenziali di acido ferulico.

Le cellule sono state coltivate utilizzando quantità variabili di sodio succinato come fonte di carbonio. La resa molare è espressa come moli di vanillina prodotta per moli di acido ferulico consumato.

Fonte di carbonio	Acido ferulico (g/l)				
	Fornito	Residuo (18 hr)	Consumato (18 hr)	Vanillina (g/l) (18 hr)	Resa molare
0,1%	2,30	0,34	1,96	0,90	0,46
0,6%	2,50	0,52	1,98	0,95	0,50

Nelle due condizioni esaminate la quantità dei prodotti (vanillina e acido vanillico) e la quantità di acido ferulico residuo, dopo 24 ore di bioconversione, sono comparabili. Nelle prime tre ore di bioconversione, il tasso di produzione di vanillina è più alto se si usano cellule cresciute in presenza di sodio succinato 0,6% (w/v): 48 mg di vanillina per grammo di biomassa per ora contro, i 31 mg di vanillina per grammo di biomassa per ora, ottenuti con cellule cresciute su sodio succinato 0,1% (w/v). Le aggiunte sequenziali di acido ferulico permettono (Figura 35A) di mantenere costante il tasso di produzione della vanillina per almeno 6 ore, favorendone l'accumulo in quantità elevate. Aumentando le quantità di sodio succinato nel mezzo di coltura è possibile incrementare la produzione di biomassa, raggiungendo quantità cellulari comparabili a quelle ottenute coltivando il ceppo in terreno LB.

Figura 35: Produzione di vanillina e acido vanillico e consumo di acido ferulico con cellule cresciute in terreno salino contenente sodio succinato 0,1% (A) o 0,6% (B).



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 3 g (peso umido)/l di cellule resting e 2,3 g/l di acido ferulico (Figura 35A) e 2,5 g/l di acido ferulico (Figura 35B).

4.7 *Modalità di conservazione della biomassa*

Infine sono state condotte prove per valutare la possibilità di conservare la biomassa che si intende utilizzare negli esperimenti di bioconversione. Le cellule sono state coltivate in terreno salino M9 contenente sodio succinato (0,6% w/v), sospese in tampone di bioconversione privo di acido ferulico e conservate a +4°C o a -80°C, previo aggiunta di glicerolo (20%) come agente stabilizzante, come descritto in Materiali e Metodi (Sezione 2.8.1c).

La bioconversione con biomassa conservata a +4°C è stata eseguita dopo 24 ore di conservazione, mentre la bioconversione con biomassa congelata a -80°C è stata eseguita dopo 24 ore, 48 ore e 10 giorni dal congelamento.

Come mostrato nella Tabella 16, dopo 24 ore di conservazione, cellule conservate a + 4°C consumano più efficientemente l'acido ferulico ma accumulano meno vanillina.

Il congelamento per 10 giorni a -80°C riduce la capacità delle cellule di consumare efficientemente il substrato, ma aumenta la selettività del processo: la resa molare passa da 0,53 (T=0) a 0,65 (10 D a -80°C). In conclusione la produzione e l'impiego della biomassa può essere effettuata in momenti temporali distinti se la biomassa viene conservata a -80°C.

Tabella 15: Resa molare (moli di vanillina prodotte/moli di acido ferulico consumate) ottenuta con cellule conservate a +4°C e congelate a -80°C.

Tempo	Resa molare
0	0,530
-80°C 1 D	0,522
-80°C 2 D	0,494
-80°C 10 D	0,655
4 °C 1 D	0,411

5 *Ingegneria metabolica di Escherichia coli per la produzione di biovanillina*

Nella seconda parte di questo lavoro di tesi, utilizzando tecniche di ingegneria metabolica, è stato costruito un nuovo ceppo di *E. coli* che fosse in grado di convertire l'acido ferulico in vanillina.

Nel corso di studi precedenti è stato dimostrato che *E. coli* può essere utilizzato come ospite per esprimere i geni che codificano per la feruloil-CoA sintetasi (Fcs) e la feruloil-CoA idratasi/aldolasi (Ech; Overhage *et al.*, 2003), gli enzimi della via non β -ossidativa CoA dipendente, responsabili della conversione dell'acido ferulico in vanillina.

Questa strategia è già stata utilizzata per ottenere alcuni ceppi di *E. coli* in grado di sintetizzare vanillina (Introduzione, Sezione 1.8.2), questi ceppi, però, sebbene producano quantità significative di vanillina (Barghini *et al.*, 2007), presentano instabilità genetica che ne limita l'impiego su scala industriale. Questa instabilità è in parte correlata alla tossicità della vanillina (una sovrapproduzione degli enzimi responsabili della sintesi di queste molecole è tossica per *E. coli*) ed in parte all'impiego di vettori di clonaggio episomali.

Per ottenere quindi un biocatalizzatore stabile, in questo lavoro di tesi, è stata valutata la possibilità di integrare i geni catabolici nel cromosoma dell'organismo ospite, in modo da coniugare le esigenze di mantenere basso il numero di copie ei geni catabolici con la stabilità genetica del ceppo ricombinante.

Inoltre, avendo dimostrato (Converti *et al.*, 2003), che l'ottenimento di biocatalizzatori in grado di convertire efficientemente l'acido ferulico in vanillina dipende in modo significativo dal ceppo di *E. coli* che viene utilizzato, le analisi preliminari sono state condotte con il ceppo JM109, utilizzato da Barghini *et al.*, 2007 e due ceppi wild type, MG1655 (*E. coli* K12) ed il CGCS5365 (*E. coli* B), che non sono mai stati ingegnerizzati per ottenere sintesi di vanillina a partire da acido ferulico.

I geni che codificano per la feruloil-CoA sintetasi e feruloil-CoA idratasi/aldolasi sono stati inseriti nei tre ceppi per trasformazione, utilizzando il plasmide ricombinante pFR0 (Materiali e Metodi, Sezione 2.7) e con le cellule così ottenute sono stati allestiti esperimenti di bioconversione in tampone fosfato salino (Materiali e Metodi Sezione 2.8) per valutare la capacità dei tre ceppi di convertire l'acido ferulico in vanillina.

Tabella 16: Resa molare in vanillina (moli di vanillina prodotte/moli di acido ferulico consumate) ottenuta utilizzando ceppi di *E. coli* trasformati con il plasmide pFR0.

<i>E. coli</i>	Resa molare
B CGCS5365	0,76 $\pm$ 0,02
JM109	0,73 $\pm$ 0,01
MG1655	0,49 $\pm$ 0,03

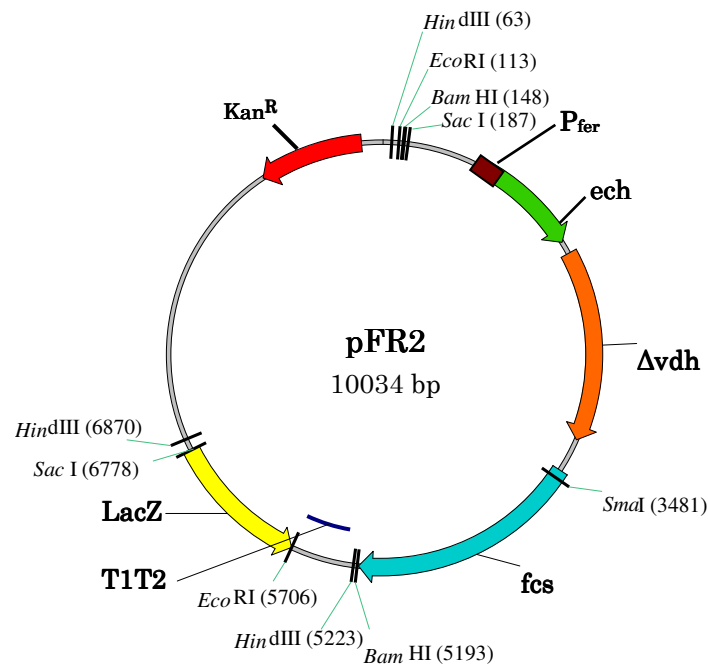
I valori di rese molarie in vanillina (Tabella 16), relative a 24 ore di bioconversione, indica che i ceppi più idonei per la conversione dell'acido ferulico in vanillina sono: JM109 e B CGCS5365. Per le prove successive si è deciso di continuare a lavorare con il ceppo JM109, già utilizzato per lo sviluppo di precedenti biocatalizzatori.

L'integrazione dei geni per il catabolismo dell'acido ferulico nel cromosoma di JM109 è stata ottenuta utilizzando il vettore (pFR2) contenente un'origine di replicazione temperatura sensibile (pLOI2227) ed una porzione del gene che codifica per la β -galattosidasi, il locus utilizzato come bersaglio dell'integrazione.

Nel plasmide ricombinante pFR2 sono presenti le sequenze del vettore pLOI2227, un frammento di 5.036 bp che comprende i geni *fcs* e *ech* di *P fluorescens* BF13 ed un frammento di 1.072 bp che codifica per la porzione C-terminale della β -galattosidasi di *E. coli* (Materiali e Metodi Sezione 2.7; Figura 36).

Figura 36: Mappa del plasmide ricombinate pFR2.

Sono indicati i geni *fcs*, *ech*, Δvdh ed il promotore P_{fer} (cassetta catabolica), una porzione la porzione C-terminale del gene *LacZ*, il gene per la resistenza all'antibiotico kanamicina (Km^R) ed il terminatore di trascrizione (T1 T2).



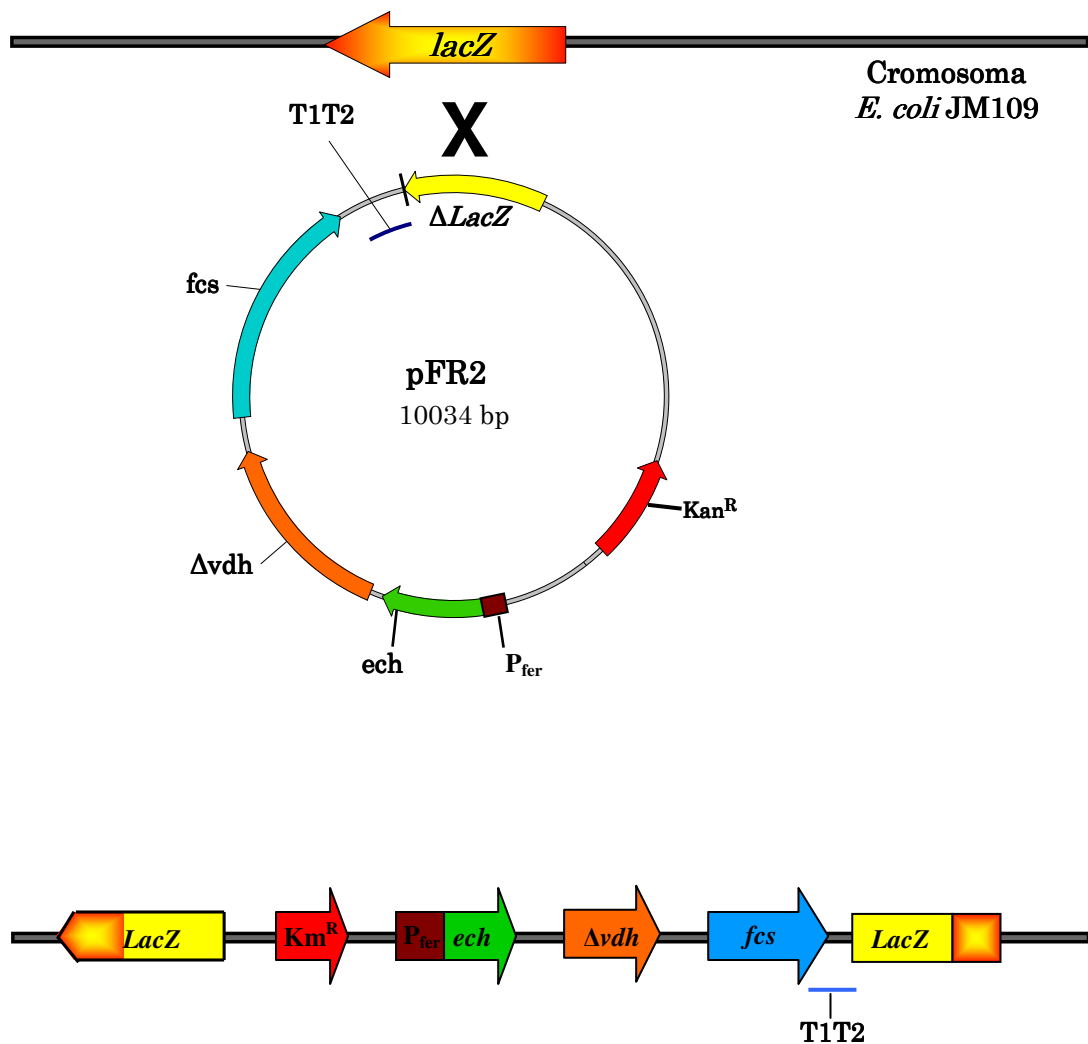
5.1 Selezione degli integranti

Avendo il plasmide pFR2 un'origine di replicazione temperatura sensibile, coltivando il trasformatante a temperatura permissiva (30°C), il plasmide viene mantenuto in forma episomale. Coltivando il trasformatante a temperatura non permissiva (44°C), invece, il plasmide viene perso e, per essere conservate, le sequenze plasmidiche devono integrarsi, per ricombinazione sito specifica, nel cromosoma (Figura 37).

Per la selezione degli integranti, cellule trasformate di *E. coli* JM109(pFR2) sono state cresciute overnight a 30°C in terreno LB contenente kanamicina (25 µg/ml). Una aliquota delle colture, circa 10^6 - 10^7 trasformanti, è stata piastrata su terreno selettivo (LB-agar contenente kanamicina) e le piastre sono state incubate a 44°C per 24 ore per permettere la formazione delle colonie degli integranti. La crescita su piastra in condizioni di temperatura non permissiva e in presenza di antibiotico, come detto, è possibile solo a seguito di un evento di integrazione delle sequenze presenti sul plasmide.

Figura 37: Evento di ricombinazione che permette l'integrazione del plasmide pFR2 nel cromosoma di *E. coli*.

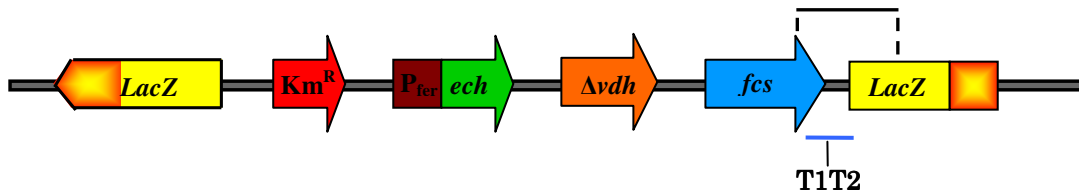
Cassetta catabolica (*fcs*, *ech* e *vdh*^{*}); promotore (*P_{fer}*); marcatore di selezione per la kanamicina (*Km^R*); terminatori della trascrizione (T1 T2); gene per la β-galattosidasi (*lacZ*).



Locus cromosomale dopo l'integrazione

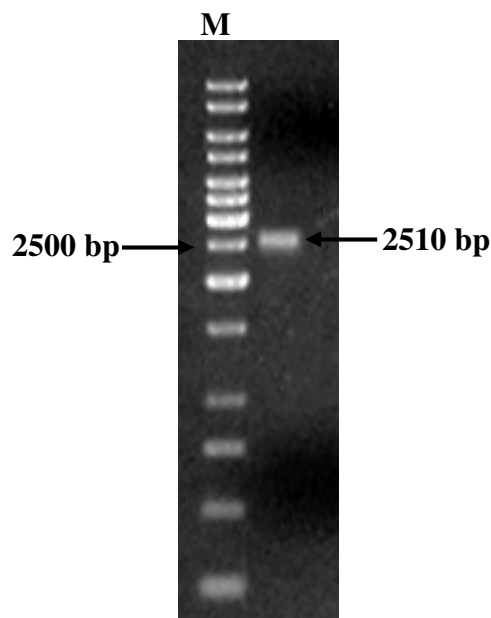
L'integrazione del plasmide pFR2 nel locus *lacZ* è stata confermata mediante una reazione di PCR utilizzando, come stampo, DNA genomico estratto dai cloni *Km^R* cresciuti a 44°C. La reazione è stata condotta utilizzando una coppia di primers che permette di amplificare un frammento di 2.510 bp contenente una porzione cromosomale del gene *LacZ* ed una porzione delle sequenze del gene *fcs* presente sul plasmide (Figura 38).

Figura 38: Siti di appaiamento dei primers (linee discontinue) e regione amplificata (linea continua).



L'analisi elettroforetica del prodotto di amplificazione ottenuto utilizzando DNA estratto da uno dei cloni Km^R cresciuti a $44^{\circ}C$, ha confermato l'integrazione del plasmide nel cromosoma del ceppo JM109 (Figura 39).

Figura 39: Prodotto di amplificazione della regione *lacZ* genomico-sequenza C-terminale gene *fcs*. M= marker 1 Kb.



5.2 Prove di bioconversione

5.2.1 Valutazione delle capacità catalitiche del ceppo ricombinante

FR13: ottimizzazione delle temperature di crescita e bioconversione

In un lavoro precedente (Barghini et al., 2007) è stato dimostrato che, la temperatura alla quale viene coltivato il microrganismo e quella utilizzata per la reazione di bioconversione, influenza in modo significativo, la capacità di cellule ingegnerizzate di *E. coli* di consumare velocemente l'acido ferulico e di accumulare quantità elevate di vanillina.

Sono state allestite, quindi, prove per valutare se la temperatura di crescita esercitasse un effetto simile sulla capacità del ceppo FR13 di sintetizzare vanillina a partire da acido ferulico.

E' stata allestita una coltura overnight del ceppo FR13 in terreno LB addizionato con kanamicina (25 µg/ml). La coltura, fatta crescere a 44°C (temperatura non permissiva), è stata successivamente diluita in un volume di terreno fresco e messa ad incubare a temperature comprese tra 30°C e 44°C, il tempo necessario per ottenere una duplicazione cellulare (~3 ore). La biomassa è stata quindi recuperata per centrifugazione ed utilizzata direttamente per le prove di bioconversione con acido ferulico.

In una seconda serie di prove è stato valutato l'effetto della temperatura di bioconversione sulla produttività oraria specifica del ceppo ingegnerizzato FR13.

A partire da una coltura cresciuta a temperatura non permissiva ed adattata a 30°C, sono state allestite prove di bioconversione, incubando la biomassa a temperature comprese tra 30 °C e 44°C.

Tutte le prove di bioconversione sono state condotte con 4,5 g (peso umido)/l di biomassa ed 1 g/l di acido ferulico emendando il tampone di bioconversione con estratto di lievito (0,005% w/v), come fonte di fattori nutrizionali.

Tabella 17: Produttività oraria specifica ottenuta con cellule provenienti da colture cresciute a varie temperature.

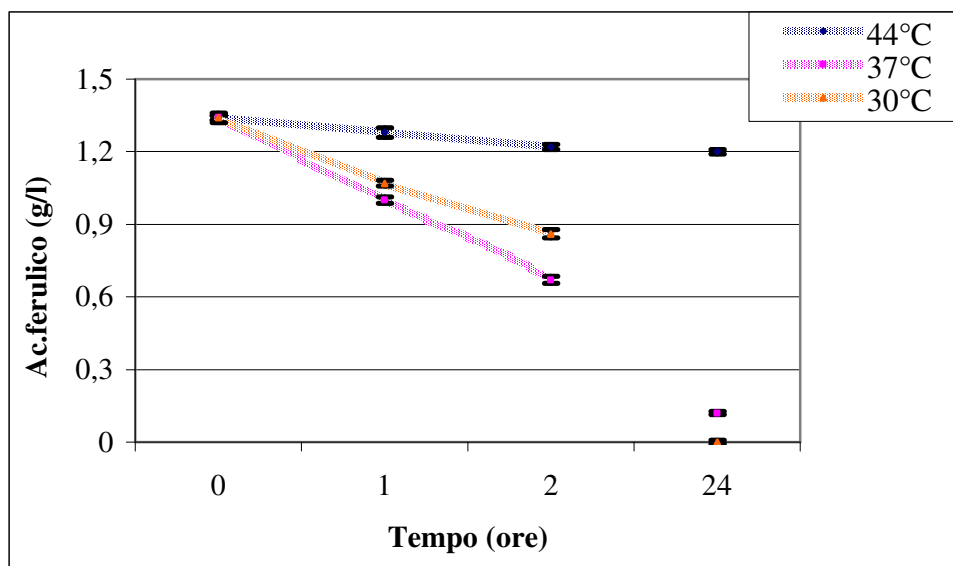
Temperatura di crescita (°C)	Produttività specifica (moli vanillina/g biomassa/ora) §
30	0,044 ± 0,007
37	0,042 ± 0,005
44	0,037 ± 0,001

§ I valori riportati nella Tabella si riferiscono alla media ± S.D. di prove indipendenti.

I risultati mostrati nella Tabella 17, indicano che la temperatura utilizzata per la crescita del ceppo FR13 influenza la produttività specifica di vanillina. Un incremento maggiore del 20% sulla produttività specifica si ha utilizzando cellule che hanno effettuato una duplicazione a 30°C. Questo risultato è in accordo con le osservazioni di Barghini *et al.* (2007), che hanno mostrato che la crescita del microrganismo a temperature sub-ottimali (< 37°C) può favorire la produzione di vanillina in *E. coli*.

La produttività specifica relativamente bassa rilevata coltivando il ceppo FR13 a 44°C (una temperatura che favorisce il mantenimento delle sequenze plasmidiche in forma integrata), potrebbe indicare, che questa temperatura ha un effetto negativo sull'attività catalitica della feruloil-CoA sintetasi, l'enzima responsabile della conversione dell'acido ferulico in feruloil-CoA. In accordo con questa ipotesi, è stato osservato che coltivando il microrganismo a 30°C e mettendo ad incubare le cellule a 44°C, il 90% del substrato fornito non viene consumato, dopo 24 ore di incubazione. Invece, nell'arco delle 24 ore, tutto il substrato fornito viene consumato se le cellule resting vengono messe ad incubare a 30°C o a 37°C (Figura 40). La produttività oraria di vanillina più elevata (Tabella 18) si ottiene, comunque, effettuando la bioconversione a 30°C, come osservato in precedenza con il ceppo JM109(pBB1) [Barghini *et al.* (2007)]. In conclusione, sebbene sia opportuno coltivare il ceppo FR13 a temperatura non permissiva (44°C) per favorire il mantenimento stabile delle sequenze integrate, coltivando il microrganismo a 30°C per una generazione, ed utilizzando la temperatura di 30°C per l'incubazione delle cellule resting è possibile ottenere una produttività specifica in vanillina più elevata e con un consumo più rapido dell'acido ferulico.

Figura 40: Consumo di acido ferulico in esperimenti di bioconversione condotti a diverse temperature utilizzando cellule cresciute a 30°C.



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 4,5 g (peso umido)/l di cellule resting e 1 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti.

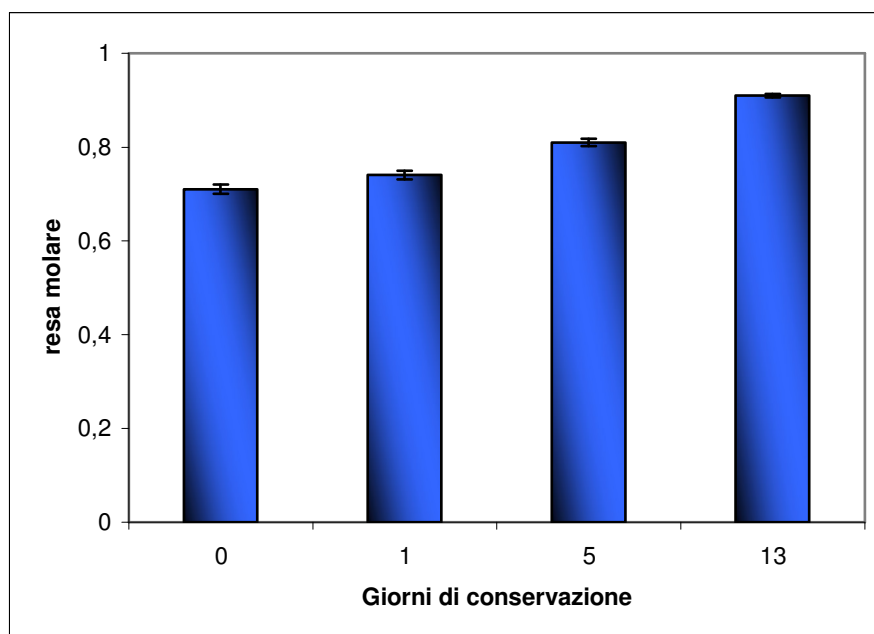
Tabella 18: Effetto delle temperature sulla produttività oraria specifica in vanillina.

Temperatura di bioconversione (°C)	Produttività specifica (moli vanillina/g biomassa/ora)
30	$0,044 \pm 0,007$
37	$0,031 \pm 0,006$
44	$0,001 \pm 0,009$

5.2.2 Effetto delle basse temperature sull'efficienza del biocatalizzatore

Successivamente è stata valutata la possibilità di conservare la biomassa a +4°C per poterla poi utilizzare in tempi successivi. La coltura cresciuta a 44°C è stata diluita e trasferita a 30°C per 3 ore, la biomassa è stata raccolta per centrifugazione e risospesa in tampone salino M9 (Materiali e Metodi, Sezione 2.8.1c), in modo da avere una sospensione cellulare a densità di 4,5 g (peso umido) /l. Le cellule, quindi, sono state trasferite in un incubatore a +4°C per un tempo compreso tra 1 e 13 giorni.

Figura 41: Resa molare in vanillina ottenuta conservando la biomassa a +4°C per tempi variabili.



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 4,5 g (peso umido)/l di cellule resting e 1 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti.

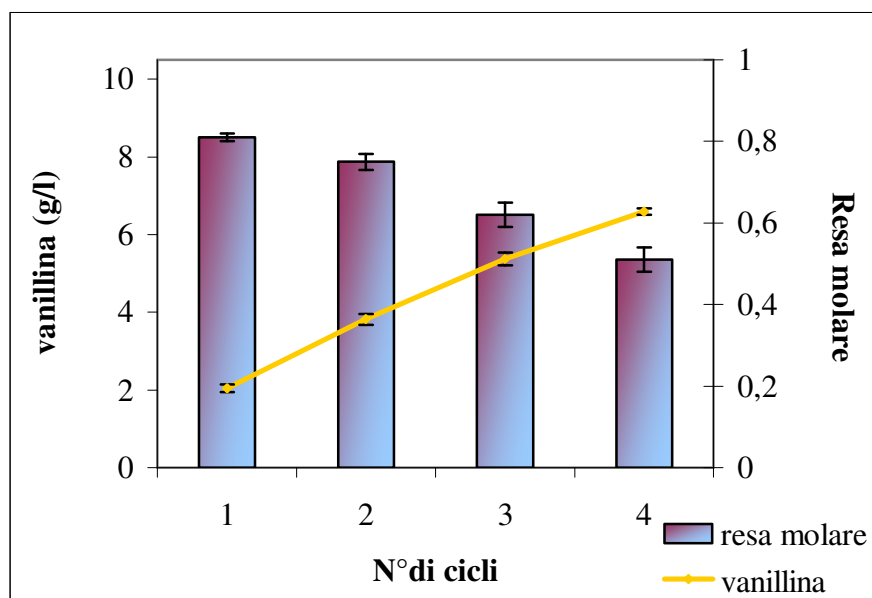
I risultati ottenuti nelle prove di bioconversione (Figura 41) effettuate utilizzando le cellule conservate a +4°C, indicano che la resa molare in vanillina aumenta prolungando l'incubazione a +4°C per un periodo compreso tra 5 e 13 giorni: l'aumento è rispettivamente del 12% (5 giorni) e del 30% (13 giorni).

5.2.3 Utilizzo della biomassa per cicli successivi di bioconversione

In un processo di bioconversione basato sull'impiego di cellule resting, la produzione della biomassa influisce in modo significativo sul costo finale del prodotto. Tale costo potrebbe essere, in parte, ridotto se fosse possibile riutilizzare la biomassa per cicli successivi di bioconversione.

Cellule conservate per 5 giorni a +4°C sono state utilizzate per quattro cicli di bioconversione consecutivi. Ogni 24 ore la biomassa è stata recuperata per centrifugazione, pesata, e risospesa a concentrazione costanti (4,5 g [peso umido]/l di biomassa) e in presenza di 1,45 g/l di acido ferulico.

Figura 42: Produzione di vanillina e resa molare ottenuta con cellule conservate a +4°C per 5 giorni ed utilizzata per allestire 4 cicli di bioconversione.



Le bioconversioni sono state condotte in tampone salino (Materiali e Metodi, Sez. 2.8) con 4,5 g (peso umido)/l di cellule resting e 1,45 g/l di acido ferulico. I valori riportati nella Figura si riferiscono alla media $\pm$ S.D. dei valori ottenuti in prove indipendenti.

I risultati ottenuti alla fine dei singoli cicli di bioconversione indicano che (Figura 42), è possibile riutilizzare la biomassa del ceppo FR13 per quattro cicli consecutivi di bioconversione. Si osserva un decremento nella resa molare in vanillina che, anche al quarto ciclo rimane al di sopra di 0,5 moli di vanillina prodotte/moli di acido ferulico consumate.

Al termine del primo ciclo la quantità di vanillina prodotta per litro di coltura è 2,04 g/l, riutilizzando la biomassa la quantità di vanillina prodotta per litro di coltura può essere incrementata di 3 volte. Utilizzando il ceppo FR13 è possibile ottenere, con quattro cicli successivi di bioconversione, 6,6 g di vanillina per litro di coltura senza dover utilizzare resine per allontanare il prodotto dal mezzo di bioconversione.

Questa è la produttività in vanillina più alta ottenuta fino ad oggi con ceppi ingegnerizzati di *E. coli*, possiamo quindi concludere che il ceppo FR13 è un buon biocatalizzatore che potrebbe trovare un utile impiego in ambito industriale.

6 *Analisi preliminare dei costi*

Considerando le condizioni migliori per la coltivazione e l'impiego dei due microrganismi ingegnerizzati descritti in questo lavoro di tesi, è stata effettuata un'analisi preliminare dei costi di un eventuale processo di sintesi della vanillina.

Dal momento che il processo proposto è basato sull'impiego di cellule resting, l'analisi dei costi è stata effettuata considerando il costo del terreno di coltura e dell'acido ferulico utilizzato come substrato per la sintesi della vanillina.

Per il ceppo BF13-1p4(pBB1), sono state esaminate due condizioni alternative (Tabella 19):

- uso di cellule cresciute in terreno LB con acido ferulico
- uso di cellule cresciute in terreno salino M9 con sodio succinato (0,6% w/v) come fonte di carbonio.

Per il calcolo del costo di produzione della biomassa ci si è basati sulla resa in biomassa per litro di terreno e sul costo dei componenti del terreno di crescita.

Come mostrato nella Tabella 20, la condizione migliore per produrre vanillina con il ceppo ingegnerizzato di *P. fluorescens* è quella che prevede la coltivazione del microrganismo in terreno salino contenente sodio succinato come fonte di carbonio. In questa condizione i costi associati alla produzione di vanillina ammontano a 127 € per Kg di prodotto contro i 285 €/Kg calcolati per il processo basato sull'impiego di cellule cresciute su LB addizionato con acido ferulico (Tabella 20, colonna 4). Differenze così ampie nel costo di produzione della vanillina dipendono principalmente dal costo per litro del terreno di coltura (Tabella 19, colonna 2) e, in parte, alla diversa resa in biomassa (Tabella 19, colonna 3). Se il microrganismo è coltivato su LB e acido ferulico, le cellule devono essere prelevate da colture in fase esponenziale di crescita e, conseguentemente, la resa in biomassa è più bassa; crescendo BF13-1p4(pBB1) su terreno salino con sodio succinato è preferibile, invece, utilizzare per le bioconversioni cellule provenienti da colture in fase stazionaria (resa in biomassa più elevata).

Con il ceppo ingegnerizzato di *E. coli*, per effetto della maggiore quantità di biomassa prodotta per litro di terreno (Tabella 19, colonna 3), delle rese di bioconversione superiori (Tabella 20, colonna 2) e della possibilità di riutilizzare la biomassa per cicli successivi di bioconversione (Tabella 20, colonna 3), il costo stimato della vanillina è meno della metà (1,6 volte) rispetto a quello calcolato per un processo che impiega cellule di *P. fluorescens*. In ogni caso, con entrambi i sistemi microbici, è lecito aspettarsi un contenimento dei costi di produzione, avendo, su scala industriale, la possibilità di utilizzare, per la produzione della biomassa, tecniche collaudate di coltivazione ad alta densità cellulare.

Tabella 19: Costo di produzione della biomassa*

Biocatalizzatore	Costo terreno (€/L terreno)[§]	Resa biomassa (g/L terreno)	Costo x Kg biomassa (€/Kg)
<i>P. fluorescens</i> LB Ac.ferulico (0,05% w/v)	0,273	7,5	36,40
<i>P. fluorescens</i> M9 Succinato (0,6% w/v)	0,109	8,6	12,60
<i>E. coli</i> LB	0,263	10,0	23,60

[§]calcolato in base al costo degli ingredienti di grado industriale

Tabella 20: Costo di produzione della vanillina*

Biocatalizzatore	Resa molare (%)	vanillina prodotta/biomassa utilizzata (Kg/Kg)	Costo della vanillina (€/Kg)*
<i>P. fluorescens</i> LB Ac.ferulico (0,05%)	50	0,167	285
<i>P. fluorescens</i> M9 Succinato (0,6%)	50	0,330	127
<i>E. coli</i> LB	65	1,460	81

*calcolato in base ai costi per Kg della biomassa (Tabella 19), dell'acido ferulico e alla resa percentuale di bioconversione (moli di vanillina prodotta/moli di ferulico consumato x 100).

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono state individuate le condizioni ottimali per l'impiego di ceppi ingegnerizzati di *Pseudomonas* ed *Escherichia coli* nella produzione biotecnologica di vanillina a partire da acido ferulico. I biocatalizzatori microbici utilizzati per questa applicazione sono: un mutante del ceppo *P. fluorescens* BF13 che accumula aldeide vanillica in presenza di acido ferulico, avendo perso la capacità di ossidare l'aldeide vanillica ad acido vanillico, e un ceppo di *E. coli* al quale è stata conferita la capacità di convertire l'acido ferulico in vanillina mediante tecniche di ingegneria metabolica.

Le potenzialità produttive di questi microrganismi sono state valutate utilizzando cellule resting e ottimizzando sia le condizioni di coltivazione del microrganismo che quelle di impiego della biomassa nella conversione dell'acido ferulico in aldeide vanillica.

- ***Pseudomonas fluorescens* BF13-1p4(pBB1)**

Con il ceppo di *P. fluorescens* sono state ottimizzate le condizioni di produzione della biomassa sia su terreno complesso LB che su terreno salino M9 emendato con sodio succinato (0,6% w/v). I risultati ottenuti hanno permesso di dimostrare che, a prescindere dal terreno utilizzato per la coltivazione del microrganismo, utilizzando cellule di BF13-1p4(pBB1) si ottiene una resa di bioconversione di 0,50 moli di aldeide vanillica prodotta per mole di acido ferulico consumato. Le condizioni ottimali per la coltivazione del microrganismo sui due terreni di coltura sono, però, molto diverse. Se si usa il terreno LB, le cellule da utilizzare per la bioconversione devono provenire da colture in fase esponenziale di crescita; impiegando terreno salino emendato con sodio succinato come fonte di carbonio, le colture devono essere in fase stazionaria. Inoltre, se il ceppo è cresciuto su LB, il terreno deve essere emendato con acido ferulico, mentre non è necessario aggiungere alcun induttore al terreno salino per stimolare la produzione degli enzimi responsabili della conversione dell'acido ferulico in aldeide vanillica. L'esposizione delle cellule all'acido ferulico deve essere, comunque, limitata nel tempo durante la fase di crescita. E' stato, infatti, osservato che l'accumulo di aldeide vanillica nel mezzo di coltura può, a sua volta, stimolare la produzione di enzimi ossidativi attivi su questo composto, il che riduce in modo significativo la capacità produttiva del microrganismo.

Un'analisi preliminare dei costi ha evidenziato che la scelta del mezzo di coltura, sebbene non abbia effetto sulla resa in vanillina, può influire in modo significativo sul costo complessivo del processo. Questo costo può essere ridotto utilizzando ingredienti

di grado industriale (a minor grado di purezza e a minor costo) e, a parità di resa in vanillina, optando per i terreni di coltura a minor costo; l'utilizzo del terreno salino, per esempio, permette di ridurre il costo complessivo di produzione della vanillina di circa 2,2 volte.

Indipendentemente dal terreno utilizzato per la produzione di biomassa, la quantità più elevata di vanillina è stata ottenuta con concentrazioni di biomassa di 3 g[peso umido]/l; l'utilizzo di quantità più elevate di biomassa (4-6 g[peso umido]/l) non ha consentito di aumentare la quantità di vanillina prodotta e quindi non è consigliabile per l'economicità del processo.

E' stato, anche, dimostrato che la quantità iniziale di acido ferulico presente nel tampone di bioconversione influisce in modo significativo sulla quantità massima di vanillina prodotta; il substrato, se presente ad elevate concentrazioni, risulta essere tossico per le cellule e durante la bioconversione, per effetto di questa tossicità, si osserva una riduzione del tasso di produzione e della quantità di vanillina prodotta.

Per ottenere una maggiore quantità di vanillina, l'acido ferulico deve essere aggiunto al tampone di bioconversione in aliquote sequenziali, il che permette di mantenere costante il tasso di produzione della vanillina favorendone l'accumulo in quantità elevate.

Lo scale up del processo, in fermentatore da 15 L, ha permesso di dimostrare che è possibile produrre quantità elevate di biomassa del ceppo BF13-1p4(pBB1), utilizzando anche materie prime con minor grado di purezza, senza effetti negativi sulla capacità del microrganismo di convertire efficientemente l'acido ferulico in vanillina.

In fine, è stata messa a punto una metodica per la conservazione della biomassa che prevede il congelamento delle cellule a -80°C; inaspettatamente, un trattamento di 10 giorni a questa temperatura permette di incrementare la resa molare in vanillina durante il processo di bioconversione.

▪ ***E. coli* JM109 FR13**

In questo lavoro di tesi, utilizzando un nuovo approccio sperimentale, è stato sviluppato un ceppo di *E. coli*, geneticamente stabile, che fosse in grado di produrre, efficientemente, vanillina a partire da acido ferulico. Nel ceppo FR13, i geni che conferiscono a *E. coli* la capacità di convertire l'acido ferulico in vanillina sono stati integrati nel cromosoma dell'ospite, ottenendo un biocatalizzatore stabile, più efficiente nella produzione di vanillina anche del microrganismo (*P. fluorescens* BF13) dal quale sono stati presi i geni catabolici.

Con il ceppo FR13, utilizzando un protocollo sperimentale appositamente sviluppato, che prevede un condizionamento della biomassa a +4°C (per almeno 5 giorni) e un riutilizzo della biomassa per cicli successivi di bioconversione, è possibile ottenere 6,6 grammi di vanillina per grammo di biomassa. Considerato che l'aldeide vanillica è, comunque, tossica per le cellule *resting*, si può pensare di aumentare la quantità di aldeide vanillica prodotta, che è già la più alta ottenuta con ceppi ingegnerizzati di *E. coli*, evitando, con sistemi di estrazione in continuo, che il prodotto si accumuli nel mezzo di bioconversione.

Con il ceppo FR13, per effetto della migliore produttività di biomassa e della resa molare in aldeide vanillica più elevata (0,65 moli di vanillina prodotta per mole di acido ferulico consumata), i costi associati alla produzione di vanillina sono meno della metà (1,6 volte) di quelli calcolati per il ceppo BF13-1p4(pBB1) cresciuto su terreno salino emendato con sodio succinato.

Poiché il costo di produzione di aldeide vanillica è fortemente influenzato dalla resa in biomassa e dal costo del substrato (negli ultimi due anni il prezzo dell'acido ferulico di grado industriale è salito da 33 a 60 €/Kg), un contenimento significativo dei costi del processo potrebbe essere ottenuto aumentando la resa in biomassa con colture ad alta densità cellulare e utilizzando, come fonte di acido ferulico, scarti agro-industriali ricchi in questo composto. Ricerche recenti, svolte in collaborazione con Di Gioia *et al.* (2007), hanno permesso di dimostrare che l'acido ferulico liberato dalla crusca di frumento mediante idrolisi enzimatica può essere utilizzato efficientemente da ceppi ingegnerizzati di *E. coli* per produrre aldeide vanillica. Questo risultato, insieme ai nuovi biocatalizzatori descritti in questo studio, apre nuove prospettive per lo sviluppo di processi competitivi di sintesi dell'aldeide vanillica per via biotecnologica.

BIBLIOGRAFIA

- **Abraham, W.R., Arfmann, H.A., Stumpf, S., Washausen, P., Kieslich, K. (1988).** Microbial transformation of some terpenoids and natural compounds. *Bioflavour '87, Analysis, Biochemistry, Biotechnology*. 399-414.
- **Achterholt, S., Priefert, H., Steinbüchel, A. (2000).** Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol*. **54**: 799–807.
- **Ager, D.J., Pantaleoe, D.P., Henderson, S.A., Katrizka, A.R., Prakash, I., Walters, D.E. (1998).** Synthetische nicht nutritive substoffe. *Angewandte. Chemie*. **110**: 1901-1916.
- **Akin, D.E., Hartley, R.D., Rigsby, L.L., Morrison, W.H. (1992).** Phenolic acids released from bermudagrass (*Cynodon dactylon*) by sequential sodium hydroxide treatment in relation to biodegradation of cell types. *J. Sci. Food Agric*. **58**: 207-214.
- **Ander, P., Hatakka, A., Eriksson, K-E. (1980).** Vanillic acid metabolism by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol*. **125**: 189-202.
- **Ander, P., Eriksson, K-E., Yu, H-S. (1983).** Vanillic acid metabolism by *Sporotrichum pulverulentum*: evidence for demethoxylation before ring-cleavage. *Arch. Microbiol*. **136**: 1-6.
- **Ander, P., Mishra, C., Farrel, R.L., Eriksson K-EL. (1990).** Redox reactions in lignin degradation: interactions between laccase, different peroxidases and cellobiose: quinone oxidoreductase. *J. Biotechnol*. **13**: 189-198.
- **Andreoni, V., Galli, E., Galliani, G. (1984).** Metabolism of ferulic acid by a facultatively anaerobic strain of *Pseudomonas cepacia*. *System. Appl. Microbial*. **5**: 299-304.
- **Andreoni, V., Bestetti, G. (1988).** Ferulic acid degradation encode by a catabolic plasmid. *FEMS Microbiol. Ecol*. **53**: 129-132.
- **Andreoni, V., Bernasconi, S., Sestetti, G., (1995).** Biotrasformation of ferulic acid and related compounds by mutant strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **42**: 830-835.
- **Antrim, R.L., Harris, D.W. (1997).** Method for treatment of corn hulls. USA patent n°4038481.
- **Arfmann, H.A., Abraham, W.R. (1989).** Microbial formation of substitute styrenes. *Z. Naturforsch*. **44c**: 765-770.

- **Audras, B., More, J. (1996).** Procédé de production de vanilline à partir de précurseurs benzéniques par bioconversion. Patent application WO9634971.
- **Ausubel, F.M. Brent, R. Kingston, R.E. Moore, D.D. Seidman, J.G. Smith, J.A. Struhl, K. (1997).** Current Protocols in Molecular Biology.
- **Barghini, P., Montebove, F., Ruzzi, M., Schiesser, A. (1998).** Optimal conditions for bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by *Pseudomonas fluorescens* BF13 cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. **49**: 309-314.
- **Barghini, P., Di Gioia, D., Fava, F., Ruzzi, M. (2007).** Vanillin production using metabolically engineered *Escherichia coli* under non-growing conditions. Microb. Cell Fact. April 2007.
- **Barraclough, A.J., Cheetham, P.S.J., Westcott, R.J. (1994).** Production of vanillin. Patent application WO9413614.
- **Barthelmebs, L., Divies, C., Cavin, J.F. (2000).** Knockout of the *p*-coumaric decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 3368-3375.
- **Berry, A. (1996).** Improving production of aromatic compounds in *E. coli* by metabolic engineering. Trends in Biotechnol. **14**: 250-256.
- **Bingen, E., Picard, B., Brahimi, N., Mathy, S., Desjardins, P., Elion, J., Denamur, E. (1998).** Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. J. Infect. Dis. **177**:642–650.
- **Birnboim, H.C., (1983).** A rapid alkaline extraction for the isolation of plasmid DNA. Meth. Enzymol. **100**: 243-247.
- **Blum, D.L., Kataeva, I.A., Li, X.L., Ljungdahl, L.G. (2000).** Feruloyl esterase activity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ. J. Bacteriol. **182**: 1346-1351.
- **Boyd, E.F., Hartl, D.L. (1998).** Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. J. Bacteriol. **180**:1159–1165.
- **Bonnin, E., Lesage-Meessen, L., Asther, M., Thibault, J.F. (1999).** Enhanced bioconversion of vanillic acid into vanillin by the use of "natural" cellobiose. J. Sci. Food. Agric. **79**: 484-486.

- **Brandt; K., Thewes, S., Overhage, J., Priefert, H., Steinbüchel, A. (2001).** Characterization of the eugenol hydroxylase genes (*ehyA/ehyB*) from the new eugenol degrading *Pseudomonas* sp. Strain OPS1. Appl. Microbiol. Biotechnol. **56**: 724-730.
- **Burri, J., Graf, M., Lambelet, P. and Löliger, J., (1989).** Vanillin: more than a flavouring agent a potent antioxidant. J. Sci. Food Agric. **48**: 49–56.
- **Buswell, J.A., Eriksson, K-E., Gupta, J.K., Hamp, S.G., Nordh, I. (1982).** Vanillic acid metabolism by selected soft-rot, brown-rot and white-rot fungi. Arch. Microbiol. **131**: 366-374.
- **Butenhorn, U., Pyell, U., 1996.** Micellar electrokinetic chromatography as a screening method for the analysis of vanilla flavouring and vanilla extracts. Journal of Chromatography A. **736**: 321-332.
- **Casey, J. E Dobb, R. (1992).** Microbial routes to aromatic aldehydes. Enzyme Microbial Technol. **14**:739-747.
- **Cavin, J-F., Barthelmebs L., Guzzo, J., Van Beeumen, J., Samyn, B., Travers, J-F., Diviès, C. (1997a).** Purification and characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*. FEMS Microbiol. Lett. **147**: 291-295.
- **Cavin J-F, Barthelmebs L, Diviès C (1997b).** Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification and characterization. Appl Environ Microbiol. **63**: 1939–1944.
- **Cavin J-F, Dartois V, Diviès C (1998).** Gene cloning, transcriptional analysis, purification and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol **64**:1466–1471.
- **Cerrutti, P., Alzamora, S.M. (1996).** Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purees. International Journal of Food Microbiology. **29**: 379–386.
- **Chatterjee, T., De, B.K., Bhattacharyya, D.K. (1999).** Microbial conversion of isoeugenol to vanillin by *Rhodococcus rhodochrous*. Indian J. Chem. B. **38**: 538-541.
- **Cheetham, P.S.J., Gradley, M.L., Sime, J.T. (2000).** Flavour/aroma materials and their preparation. Patent application WO0050622.

- **Chow, K.T., Pope, M.K., Davies, J. (1999).** Characterization of a vanillic acid non-oxidative decarboxylation gene cluster from *Streptomyces* sp. D7. *Microbiology*. **145**: 2393–2403.
- **Civolani, C., Barghini, P., Roncetti, A.R., Ruzzi, M., Schiesser, A. (2000).** Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by means of a vanillate-negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* BF13. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2311-2317.
- **Clausen, M., Lamb, C. J., Mengnet, R., Doerner, P. W. (1994).** PAD1 encodes phenylacrylic acid decarboxylase which confers resistance to cinnamic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **142**: 107-112.
- **Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2000).** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4555-4558.
- **Colquhoun, I.J., Ralet, M.C. Thibault, J.F., Faulds, C.B., Williamson, G., (1994).** Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, **263**: 243-256.
- **Converti, A., De Faveri, D., Perego, P., Barghini, P., Ruzzi, M., Sene, L. (2003).** Vanillin production by recombinant strains of *Escherichia coli*. *Brazilian J. of Microbiol.* **34**: 108-110.
- **Cooper, B. (1987).** Method and microorganism for the preparation of coniferyl aldehyde. German Patent DE 3604874 A1 870820.
- **Crawford, R. L., Olson, P. P. (1978).** Microbial catabolism of vanillate: decarboxylation to guaiacol. *Appl Environ Microbiol.* **36**: 539–543.
- **Davidson, P.M. and Naidu, A.S. (2000).** Phyto-phenols. In: Naidu, A.S., Editor, 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*, CRC Press LLC, Boca Raton, London, New York, Washington, DC, pp. 265–294.
- **Degrassi, G., Polverino De Laureato, P., Bruschi, C.V. (1995).** Purification and characterization of ferulate and *p*-coumarate decarboxylase from *Bacillus pumilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 326-332.
- **De Jong, E., W. J. van Berkel, R. P. van der Zwan, and J. A. de Bont. (1992).** Purification and characterization of vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. A novel aromatic alcohol oxidase containing covalently bound FAD. *Eur. J. Biochem.* **208**: 651–657.

- **De Vos, P., Goor, M., Gillis, M., De Ley, J. (1985).** Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Bact.* **35**: 169-184.
- **Dewick, P.M. (1989).** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Prod. Rept.* **6**: 263-290.
- **Diaz, E., Ferrandez, A., Prieto, M.A., Garcia, J.L. (2001).** Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *MMBR* **65.4**: 523-569.
- **Di Gioia, D., Sciubba, L., Setti, L., Luziatelli, F., Ruzzi, M., Zanichelli, D., Fava, F. (2007).** Production of biovanillin from wheat bran. *Enzyme and Microbiol. Technol.* **41**: 498-505.
- **Dignum, M.J.W., kerler, J., Verpoorte, R. (2001).** Vanilla production: technological, chemical, and biosynthetic aspects. *Food Rev. Int.* **17**, 199-219.
- **Donaghy, J.A., Bronnenmeier, K., Soto-Kelly, P.F., McKay, A.M. (2000).** Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercorarium*. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 458-466.
- **Dougan, G., Haque, A., Pickard, D., Frankel, G., O'Goara, P., Wain, J. (2001).** The *Escherichia coli* gene pool. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 90-94.
- **Edlin, D., Narbad, A., Gasson, M.J., Dickinson, J.R., Llyod, D. (1995).** Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *Enzyme Microb. Technol.* **22**: 232-239.
- **Edlin DAN, Narbad A, Gasson MJ, Dickinson JR and Llyod D (1998).** Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *Enzyme Microb Technol.* **22**: 232–239.
- **Eggeling, L., Sahm, H. (1980).** Degradation of coniferyl alcohol and other lignin-related aromatic compounds by *Nocardia* sp DSM 1069. *Arch. Microbiol.* **126**: 141-148.
- **Enoki, A., Yajima, Y., Gold, M.H. (1981).** Olefin saturation and acid reduction of 3,4-dimethoxycinnamic acid and derivatives by *Phanerochaete chrysosporium*. *Phytochemistry* **20**: 1543-1546.
- **Eraso, S., Hartley, R.D. (1990).** Monomeric and dimeric phenolic constituents of plant cell walls-possible factors influencing wall biodegradability. *J. Sci Food Agric.* **51**: 163-170.

- **Falconnier, B., Lapierre, C., Lesage-Meessen, L., Yonnet, G., Brunerie, P., Colonna-Ceccaldi, B., Corrieu, G., Asther, M. (1994).** Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarius* I-937: Identification of metabolic pathways. *J. Biotechnol.* **37**: 123-132.
- **Faulds, C.B., Williamson, G. (1995).** Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 1082-1087.
- **Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., Narbad, A. (2004a).** The potential application of vanillin in preventing yeast spoilage of soft drinks and fruit juices, *Journal of Food Protection* **67**, pp. 391–395.
- **Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., Ueckert, J., Bos, A., Narbad, A. (2004b).** Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, **97**: 104-113.
- **Fraaije, M. W., C. Veeger, and W. J. van Berkel. (1995).** Substrate specificity of flavin-dependent vanillyl alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. Evidence for the production of 4-hydroxycinnamyl alcohols from 4-allylphenols. *Eur. J. Biochem.* **234**: 271–277.
- **Fraaije, M.W., Pikkemaat, M. e Van Berkel, W.J.H. (1997).** Enigmatic gratuitous induction of the covalent flavoprotein vanillyl alcohol oxidase in *Penicillium simplicissimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:435-439.
- **Frost, J.W., Lievense, J.C. (1994).** *New J.Chem.* **8**: 341-348.
- **Frost, J.W. (2000).** Synthesis of vanillin from a carbon source. Patent application WO0017319.
- **Gasson, M.J., Kitamura, Y., McLauchlan, W.R., Narbad, A., Parr, A.J., Lindsay, E., Parson, H., Payane, J., Rhodes, M.J.C., Walton, N.J. (1998).** Metabolism of ferulic acid to vanillin. *J. Biol. Chem.* **273**: 4163-4170.
- **Goodenough, B.R. (1982).** Vanilla, vanillin and vanilla derivatives. *Bakers Digest.* **June**: 8-10.
- **Goodey, A., Tubb, R. S. (1982).** Genetic and biochemical analysis of the ability of *Saccharomyces cerevisiae* to decarboxylate cinnamic acids. *J Gen Microbiol.* **128**: 2615-2620.
- **Graff, E. (1992).** Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biol. Med.*, **3**: 435-448.

- **Grbic-Galic, D., La Pat-Polasko, L. (1985).** *Enterobacter cloacae* DG-6 : a strain that transforms methoxylated aromatics under aerobic and anaerobic conditions. *Curr. Microbiol.* **12**: 321-324.
- **Grbic-Galic, D., Young, L. Y. (1985).** Methane fermentation of ferulate and benzoate: anaerobic degradation pathways. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**: 292-297.
- **Gross, G.G. (1977).** Biosynthesis of lignin and related monomers. The structure, biosynthesis, and degradation of wood. Proceedings of the sixteenth annual meeting of the phytochemical society of North America, Plenum, New York, Loewus FA, Runeckler VC (eds) Recent advances in phytochemistry. **11**: 141-184.
- **Gross, G.G. (1985).** Biosynthesis and metabolism of phenolic acid. In Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components (Higuchi T. ed.). Academic Press, New-York. 229-271.
- **Gross, B., Asther, M., Corrieu, G., Brunerie, P. (1991).** Production of vanillin by bioconversion of benzenic precursors. Patent application EP0453368.
- **Gupta, J.K., Hamp, J.A., Eriksson, K.E. (1981).** Metabolism of *trans*-ferulic by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbial.* **128**: 349-354.
- **Gurujeyalakshmi, G., Mahadevan, A. (1987).** Dissimilation of ferulic acid by *Bacillus subtilis*. *Curr. Microbial.* **16**: 69-73.
- **Habu, N., Samejima, M., Yoshimoto, T. (1989).** A novel dioxygenase responsible for the C-C cleavage of lignin model compounds from *Pseudomonas* sp TMY 1009. *Mukuzai Gakkaishi* **35**: 26-29.
- **Hartley, R.D. e Harrys, P.J. (1981).** Phenolic constituents of the cell walls of dicotyledons. *Biochem. System. Ecol.*, **9**: 189-203.
- **Hashikado, Y., Urashima, T., Yoshida, T., Mizutani, J. (1993).** Decarboxylative conversion of hydroxycinnamic acid by *Klebsiella oxytoca* and *Ervinia uredovora* epiphytic bacteria of *Polymnia sonchifolia* leaf, possibly associated with formation of microflora on the damaged leaves. *Biosc. Biotech. Biochem.* **57**: 215-219.
- **Havkin-Frenkel, D., Podstolski, A., Dixon, R.A. (2003).** Vanillin Biosynthetic pathway enzyme from *Vanilla Planifolia*. Patent Application WO03071861.
- **Havkin-Frenkel, D., Zylstra, G., Frenkel, C., Belanger, F. (2006).** Production of vanillin in microbial cells. Patent application 20060172402.
- **Heald, S., Myers, S., Robbins, K., Walford, T., Hill Colin, A. (2004).** Preparation of vanillin from microbial transformation media by extraction by means supercritical fluids or gases. Patent application WO2004085663.

- **Hermann, K. (1989).** Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **28**: 315-347.
- **Herzer, P.J., Inouye, S., Inouye, M., Whittam, T.S. (1990).** Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:6175–6181.
- **Hilton, M. D., Cain W. J. (1990).** Bioconversion of Cinnamic Acid to acetophenone by a Pseudomonad: Microbial Production of a Natural Flavor Compound. *Appl Environ Microbiol.* **56**: 623–627.
- **Hodgson, J. (1993).** *Bio.Technol.* **11**: 887-893.
- **Hoking, M.B., (1997).** Vanillin: synthetic flavouring from spent sulfite liquor. *J.Chem.Educ.* **74**: 1055-1059.
- **Hopp, R., Rabenhorst, J. (1994).** Process for the preparation of substituted methoxyphenols and microorganisms suitable for this purpose. Patent application EP0583687.
- **Hua, D., Ma, C., Song, L., Lin, S., Zhang, Z., Dend, Z., Xu, P. (2007).** Enhanced vanillin production from ferulic acid using adsorbent resin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 783-790.
- **Huang, Z., Dostal, L., Rosazza, J.P.N. (1993).** Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2244-2250.
- **Huang, Z., Dostal, L., Rosazza, J.P.N. (1994).** Mechanism of ferulic acid conversion to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*. *J Biol Chem.* **268**: 23594–23598
- **Iiyama, K., Lam, T.B.T., Stone, B.A. (1994).** Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.*, **104**: 315-320.
- **Ishii, T. (1997).** Structure and function of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* **127**: 111-127.
- **Ishikawa, H., Schubert, W.J., Nord, F.F. (1963).** Investigation of lignins and lignification. XXVIII. The degradation by *Polyporus versicolor* and *Fomes fomentarius* of aromatic compounds structurally related to softwood lignin. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**: 140-149.

- **Johnson, T.S., Ravishankar, G.A., Venkataraman, L.V. (1996).** Biotransformation of ferulic acid and vanillylamine to capsaicin and vanillin in immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. **44**: 117-121.
- **Johnson, J. R., Stell, A.L. (2000).** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J. Infect. Dis. **181**: 261–272.
- **Jurkova, M., Wurst, M. (1993).** Biodegradation of aromatic carboxylic acids by *Pseudomonas mira*. FEMS microbial. Lett. **11**: 245-250.
- **Kamoda, S., Habu, N., Samejima, M., Yoshimoto, T. (1989).** Purification and some properties of lignostilbene- α,β -dioxygenase responsible for the C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ cleavage of a diarylpropane type lignin model compound from *Pseudomonas* sp. TMY1009. Agric. Biol. Chem. **53**, 2757-2761.
- **Kamoda, S., Samejima, M. (1991).** Cloning of a ligno stilbene-□-□-dioxygenase gene from *Pseudomonas paucimobilis* TMY 1009 - expression in *E. coli*. Agric. Biol. Chem. **55**: 1411-1412.
- **Kamoda, S., Saburi, Y. (1993).** Structural and enzymatical comparison of lignostilbene-alpha,beta-dioxygenase isozymes, I, II, and III, from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. Biosci. Biotechnol. Biochem. **57**: 931-934.
- **Kamoda, S., Terada, T., Saburi, Y. (1997).** Purification and some properties of lignostilbene-alpha, beta-dioxygenase isozyme IV from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. Biosci Biotechnol. Biochem. **61**: 1575-1576.
- **Karmakar, B., Vohra,, R.M., Nandanwar, H., Sharma, P., Gupta, K.G., Sobti, R.C. (2000).** Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacolo and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus ciagulans*. J. Biotechnol. **80**: 195-202.
- **Kasana. R.C., Sharma, U.K., Sharma, N., Sinha, A.K. (2007).** Isolation and identification of a novel strain of *Pseudomonas chlororaphis* capable of transforming isoeugenol to vanillin. Curr. Microbiol. **54**: 457- 461.
- **Kelley, C., Harruff, R.C., Carmak, M. (1976).** The polyphenolic acids of *Lithosprum ruderale*. II. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of lithospermic acid. J. Org Chem. **41**: 449-455.
- **Knuth, M.E., Sahai, O.P. (1991).** Flavour composition and method. US Patent 5057424.

- **Krings, U., Hinz, M., Berger, R.G. (1996).** Degradation of [²H]phenylalanine by the basidiomycete *Ischnoderma benzoinum*. J. Biotechnol. **51**: 123-129.
- **Krishnamohan, W., Khanna, S. (1994).** Metabolism of ferulic acid by *Alcaligenes paradoxus*. Indian J. Microbiol. **43**: 303-306.
- **Kroon, P.A., Williamson, G. (1996).** Release of ferulic acid from sugar-beet pulp by using arabinanase, arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*. Biotechnol. Appl. Biochem. **23**: 263-267.
- **Kroon, P.A., Garcia-Conesa, M.T., Fillingham, I.J., Hazlewood, G.P., Williamson, G. (1999).** Release of ferulic dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterase. J. Sci. Food Agric. **79**: 428-434.
- **Labuda, J.M., Goers, S.K., Keon, K.A. (1992).** Bioconversion process for the production of vanillin. U.S. patent 5128253.
- **Labuda, J.M., Keon, K.A., Goers, S.K. (1993).** Microbial bioconversion process for the production of vanillin. In progress in flavour precursor studies. Analysis-generation Biotechnology. Proceedings of the International Conference (Schreier P. and P. Winterhalter, eds): 477-482, Allured Publishing Corporation, 362 Schmale Road, Carol Stream, IL 60188.
- **Lam, T.B.T., Iiyama, K. e Stone, B.A. (1992).** Changes in phenolic acids from internode walls of wheat and *Phalaris* during maturation. Phytochem., **31**: 2655-2658.
- **Lee, S.L., Cheng H-Y, Chen W-C and Chou C-C (1998).** Production of γ -decalatone from ricinoleic acid by immobilized cells of *Sporidiobolus*.
- **Lesage-Meessen, L., Delattre, M., Haon, M., Thibault, J-F, Ceccaldi, B.C., Brunerie, P., Asther, M. (1996).** A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. J. Biotechnol. **50**: 107-113.
- **Lesage-Meessen, L., Haon, M., Delattre, M., Thibault, J-F., Colonna Ceccaldi, B., Asther, M. (1997).** An attempt to channel the transformation of vanillic acid into vanillin by controlling methoxyhydroquinone formation in *Pycnoporus cinnabarinus* with cellobiose. Appl. Microbiol. Biotechnol. **47**: 393-397.
- **Li, T., Rosazza, J.P.N. (2000).** Biocatalytic synthesis of vanillin. Appl. Environ. Microbiol. **66** : 684-687.

- **Li, Y.H., Sun, Z.H., Zhao, L.Q., Xu, Y. (2005).** Bioconversion of isoeugenol into vanillin by crude enzyme extracted from soybean. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **125**: 1-10.
- **Mane, J., Zucca, J. (1993).** Process for the production of vanilla flavour by treatment of vanilla pods and vanilla flavour so produced. French Patent FR 16918801 A1.
- **Mane, J., Zucca, J. (1994).** Procédé de préparation de substances aromatiques par voie enzymatique. Patent application WO9402621.
- **Mane, J., Zucca, J. (1999).** Biochemical process for preparing aromatic substances. Patent application WO9622381.
- **Markus, P.H., Peters, A.L.J., Roos, R. (1992).** Process for the separation of phenylaldehydes. European Patent Application, EP 0 542 348 A2.
- **Markus, P.H., Roos, R., Peters, A.L.J. (1993).** Process for the preparation of phenylaldehydes. Patent application EP0542348.
- **Martinez-Morales, F., Borges, A.C., Martinez, A., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O. (1999).** Chromosomal integration of heterologous DNA in *Escherichia coli* with precise removal of markers and replicons used during construction. *Journal of bacteriol.* **181**: 7143-7148.
- **Matamoros-León, B., Argáiz, A., & López-Malo, A. (1999).** Individual and combined effects of vanillin and potassium sorbate on *Penicillium digitatum*, *Penicillium glabrum* and *Penicillium italicum* growth. *Journal of Food Protection.* **62**: 540–542.
- **Merory J. (1968).** Natural flavourings from vanilla beans. In *Food Flavourings: Composition, Manufacture and Use*, 2nd ED, AVI Publishing, Westport, CT, pp 163-182.
- **Micard, V., Renard, C., Colquhoun, I.J., Thibault, J-F. (1997).** End-products of enzymic saccharification of beet pulp, with a special attention to feruloylated oligosaccharides. *Carbohydr Polym.* **32**: 283–92.
- **Miller, J.H. (1972).** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor.
- **Mitra, A., Kitamura, Y., Gasson, M. J., Narbad, A., Parr, J., Payne, J., Rhodes, M. J., C., Sewter, C., Walton, N. J. (1999).** 4-hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase (HCHL), an enzyme of phenylpropanoid chain cleavage from *Pseudomonas*. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**: 10-16.

- **Muller-Harvey, I., Hartley, R.D., Harris, P.J., Curzon, E.H. (1986).** Linkage of *p*-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.* **148**: 71-85.
- **Müller, B., Münch, T., Muheim, A., Wetli, M. (1998).** Process for the production of vanillin. Patent application EP0885968.
- **Narbad, A., Rhodes, M.J.C., Gasson, M.J., Walton, N.J. (1997).** Production of vanillin. Patent application WO9735999.
- **Narbad, A., Gasson, M.J. (1998).** Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology.* **144**: 1397-1405.
- **Nazareth, S., Mavinkurve, S. (1986).** Degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacolo by *Fusarium solani* (Mart). *Sacc. Can. J. Microbiol.* **32**: 494-4.
- **Nishida, A., Fukuzumi, T. (1978).** Formation of coniferyl alcohol from ferulic acid by the white-rote fungus *Trametes*. *Phytochem* **17**: 417-419.
- **O'Sullivan, D.J., O'Gara, F. (1992).** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**: 662-676.
- **Oddou, J., Stentelaire, C., Lesage-Meessen, L., Asther, M., Ceccaldi, B.C. (1999).** Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 1-6.
- **Ohmiya, K., Takeuchi, M., Chen, W., Shimizu, S., Kawakami, H. (1986).** Anaerobic reduction of ferulic acid to dhydroferulic acid by *Wolinella succinogenes* from cow rumen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 274-279.
- **Overhage, J., Priefert, H., Steinbuchel, A. (1999a).** Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. Strain HR199. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4837-4847.
- **Overhage, J., Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbuchel, A. (1999b).** Biotransformation of eugenol to vanillin by a mutant of *Pseudomonas* sp. Strain HR199 constructed by disruption of the vanillin dehydrogenase (*vdh*) gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 820-828.
- **Overhage, J., Steinbüchel, A., Priefert, H. (2003).** Highly Efficient Biotransformation of Eugenol to Ferulic Acid and Further Conversion to Vanillin in Recombinant Strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol* **69**: 6569-6576.

- **Palleroni, N.J. (1992a).** Human- and animal-pathogenic *Pseudomonads*. The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Balows A., Dworkin M., Harder W. & Schleifer K-H. New York, Springer-Verlag: 3068-3103.
- **Palleroni, N.J. (1992b).** Introduction to the family Pseudomonadaceae. The Prokaryotes a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Balows A., Dworkin M., Harder W. & Schleifer K-H. New York, Springer-Verlag: 3071-3085.
- **Pak, F.E., Gropper, S., Dai, W.D., Havkin-Frenkel, D., Belanger, F.C. (2004).** Characterization of a multifunctional methyltransferase from the orchid *Vanilla planifolia*. Plant. Cell. Rep. **12**: 959-966.
- **Plaggenborg, R., Steinbüchel, A., Priefert, H. (2001).** The coenzyme A-dependent, non-beta-oxidation pathway and not direct deacetylation is the major route for ferulic acid degradation in *Delftia acidovorans*. FEMS Microbiol. Lett. **205**: 9-16.
- **Podstolski, A., Havkin-Frenkel, D. (1999).** Improved vanillin production. Patent application WO9903975.
- **Pometto, A.L., Crawford, D.L. (1983).** Whole-cell bioconversion of vanillin to vanillic acid by *Streptomyces viridosporus*. Appl. Environ. Microbiol. **45**:1582-1585.
- **Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbüchel, A. (1997).** Molecular characterisation of genes of *Pseudomonas* sp. Strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. J. Bacteriol. **179**: 2595-2607.
- **Priefert, H., Overhag, J., Steinbüchel, A. (1999).** Identification and molecular characterization of the eugenol hydroxylase genes (*ehyA/ehyB*) of *Pseudomonas* sp. Strain HR199. Arch. Microbiol. **172**: 354-363.
- **Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbüchel, A. (2001).** Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol. **56**: 296–314.
- **Prestelo, F., Falcon, M.A., de la Fuente, G. (1989).** Production of vanillic acid from vanillin by resting cells of *Serratia marcescens*. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 1660-1662.
- **Prince, R.C., Gunson, D.E. (1994).** Just plain vanilla? Trends Biochem. Sci. December: 521.

- **Pyysalo, T., Torkkeli, H., Honkanen, E. (1977).** The thermal decarboxilation of some substituted cinnamic acid. *Lebens.-Wis-Sensch. Technol.* **10**: 145-147.
- **Rabenhorst, J. (1991).** Verfahren zur herstellung von naturlichem vanillin. European Patent 0405197 A1.
- **Rabenhorst, J. (1996).** Production of metoxiphenol-type natural aroma chemicals by biotransformation of eugenol with a new *Pseudomonas* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 470-474.
- **Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., Ausubel, F.M. (1995).** Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**: 1899-1902.
- **Rahouti, M., Seigle-Murandi, F., Steiman, R., Eriksson, K.E. (1989).** Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2391-2398.
- **Ralph, J., Grabber, J.H., Hatfield, R.D. (1995).** Ligninferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr. Res.*, **275**: 167-178.
- **Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G.A., Venkatamaran, L.V. (1996).** An improved process for the preparation of vanillin. Indian Patent 1022/DEL/96.
- **Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G.A. (1999).** Biotransformation of isoeugenol to vanilla flavour metabolites and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*: study of the influence of fungal elicitor and β -cyclodextrin. *Process Biochem* **35**:341-348.
- **Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G.A. (2000).** Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *J. of the Science of Food and Agriculture.* **80**: 289-304.
- **Ranavide, A.S. (1994).** Vanilla-cultivation, curing, chemistry, technology and commercial products. In *Spices, Herbs and Hedible Fungi*, Ed by Charalambous G. Elsevier, Amsterdam. 517-577.
- **Rao, S.R., Ravishankar, G.A. (2000).** Biotransformation of protocatechuic aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. *J. Biotechnol.* **76**: 137-146.
- **Reineccius, G. (1994).** *Source Book of Flavours*, 2nd end, Chapman and Hall, New York, pp 351-361.

- **Roh, H.J., Kim, P., Park, Y.C., Choi, J.C. (2000).** Bioconversion of D-galactose into D-tagatose by expression of L-arabinose isomerase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**: 1-4.
- **Rosazza, J.P.N., Huang, Z., Dostal, L., Volm, T., Rousseau, B. (1995).** Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *J. Industrial Microbiol.* **15**: 457-471.
- **Rosegarten (1969).** The book of spices. Livingston publishing. Pennsylvania. 453-466.
- **Ruiz-Ieràn, F., Perez-Amador, I., Lòpez-Munguia, A. (2001).** Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green pods. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5207-5209.
- **Ruzzi, M., Barghini, P., Montebove, F., Schiesser, Ponente. A. (1997).** Effect of the carbon on the utilization of ferulic, *m*- and *p*-coumaric acid by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Annali di microbiologia ed Enzimologia.* **47**: 87-96.
- **Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual (second ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
- **Samejima, M., Tatarazako, N., Arakawa, T., Saburi, Y., Yoshimoto, T. (1987).** Metabolism of 3,4-dimethoxycinnamic acid and ferulic acid by mutant strains derived from *Pseudomonas* sp. TMY1009. *Mukuzai Gakkaishi* **33**: 728-734.
- **Santos, P. M., Di Bartolo, I., Blatny, J. M., Zennaoro, E., Valla, S. (2001).** New broad-host-range promoter probe vectors based on the plasmid RK2 replicon. *FEMS Microbiol. Letters.* **195**: 91-96.
- **Selander, R.K., Caugant, D.A., Whittam, T.S. (1987).** Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*, p. 1625–1648. *In* F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- **Shimoni, E., Ravid, U., Shoham, Y. (2000).** Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. *J. Biotechnol.* **78**: 1-9.
- **Shiotsu, Y., Samejima, M., Habu, N., Yoshimoto, T. (1989).** Enzymatic conversion of stilbenes from the inner bark of *Picea glehnii* into aromatic aldehydes. *Mukuzai Gakkaishi.* **35**: 826-831.

- **Smith, M. e Hartley, R. (1983).** Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydr. Res.*, **118**: 65-80.
- **Sorensen, H.P., Mortensen, K.K. (2005).** Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* **4**: 1-8.
- **Sutherland, J.B., Crawford Don L., Pometto III, A.L. (1983).** Metabolism of cinnamic, *p*-coumaric, and ferulic acids by *Streptomyces setonii*. *Can. J. Microbiol.* **29**: 1253-1257.
- **Tasada, K., Kayahara, H. (1983).** Initial steps of eugenol degradation pathway of a microorganism. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2639-2640.
- **Toms, A., Wood, J.M. (1970).** The degradation of *trans*-ferulic acid by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochemistry.* **9**: 337-343.
- **Torre, P., De Faveri, D., Perego, P., Converti, A., Barghini, P., Ruzzi, M., Faria, F.P. (2004).** Selection of Co-substrate and aeration condition for vanillin production by *Escherichia coli* JM109/pBB1. *Food. Technol. Biotechnol.* **42**: 193-196.
- **UN Food & Agriculture Organization-FAO. (2005).** <http://it.wikipedia.org/wiki/Vaniglia>.
- **Usha Tripathi, Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G.A. (1999).** A process for the preparation of vanilla flavour metabolites through biotransformation. Indian Patent NF269/99.
- **Van den Heuvel, R.R.H., Fraaije, M.W., Laane, C., van Berckel, W.J.H. (2001).** Enzymatic synthesis of vanillin. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2954-2958.
- **Walton, N.J., Mayer, M.J., Nabad A. (2003).** Vanillin. *Phytochemistry.* **63**: 505-515.
- **Washisu, S., Aida, T., Hashimoto, N. (1993).** Production of vanillin and its related compound by fermentation. Patent application JP5227980.
- **Yamada, M., Okada, Y., Yoshida. T., Nagasawa, T. (2007).** Vanillin production using *Escherichia coli* cells over-expressing isoeugenol monooxygenase of *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Lett.* Nov 2007.
- **Yoon, S-H., Li, C., Kim, J-E., Lee, S-H., Yoon, J-Y., Choi, M-S., Seo, W-T., Yang, J-K., Kim, J-Y., Kim, S-W. (2005).** Production of vanillin by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **27**: 1829-1832.

- **Yoon, S-H., Lee, E-G., Das, A., Lee, S-H., Li, C., Ryu, H-K., Choi, M-S., Seo, W-T., Kim, S-W. (2007).** Enhanced vanillin production from recombinant *E. coli* using NTG mutagenesis and adsorbent resin. *Biotechnol. Prog.* **23**: 1143-1148.
- **Yoshida, A. Takenaka, Y., Tamaki, H., Frebort, I., Adachi, O., Kumagai, H. (1997).** Vanillin formation by microbial amine oxidases from vanillylamine. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 603-605.
- **Yoshimoto, T., Samejima, M., Hanyu, N., Koma, T. (1990).** Dioxygenase for styrene cleavage manufactured by *Pseudomonas*. Patent application JP 2195871.
- **Yun, J.W., Song, C.H., Choi, J.W., Choi, Y.J., Song, S.K. (1999).** Production of inulo-oligosaccharides from inulin by recombinant *E. coli* containing endoinulinase activity. *Bioprocess Engineering.* **21**: 101-106.
- **Zabkova, M., Borges da Silva, E.A., Rodrigues, A.E. (2006).** Recovery of vanillin from Kraft lignin oxidation by ion-exchange with neutralization. *Separation and Purification Technology.* **55**: 56-68.
- **Zago, A., Degrossi, G., Bruschi, C. V. (1995).** Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus pumilus* gene for ferulic acid degradation. *Appl Environ Microbiol.* **61**: 4484-4486.
- **Zaldivar, J., Martinez, A., Ingram, L. O. (1999).** Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **65**: 24–33.
- **Zenk, M.H., Ulbrich, B., Busse, J., Stöckigt, J. (1980).** Procedure for the enzymatic synthesis and isolation of cinnamoyl-CoA thioesters using a bacterial system. *Anal Biochem* **101**: 182-187.
- **Zhihao, S., Zheng, P., Xinfu, G., Guanyu, L., Haunghua, Y., Jun, W., Yanbing, B. (2006).** Method for producing vanillic acid and vanillin from waste residue of rice bran oil by fermentation and biotransformation. Patent application EP1734128.