

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROALIMENTARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI (XXII Ciclo)

Cinetica di lisi di *Oenococcus oeni* in vino modello
di lisozima libero ed immobilizzato

SCIENZE E TECNOLOGIE AGROALIMENTARI
(AGR/15)

Coordinatore: Prof. Marco Esti

Tutor: Prof. Marco Esti

Dottorando: Raffaello Straniero

...questo è il frutto di un lavoro iniziato l'anno in cui è venuto a mancare una delle persone più importanti della mia vita. L'origine di questo cammino è stato intrapreso inizialmente grazie al suo sostegno morale ed economico. La sua prematura scomparsa, in un certo qual modo annunciata dalle sue scarse condizioni di salute, ha influito notevolmente sul modo in cui io ho affrontato tale percorso lasciandomi ormai solo a me stesso...ma è proprio quando pensavo d'esser abbandonato, quando vedevo di fronte a me soltanto il precipizio oltrepassato il quale avrei lasciato inespresso tutto ciò che avevamo iniziato...in quel momento... lui si è ripresentato a me facendomi dono della sua energia affinché non si debba mai cedere al dolore senza prima aver lavorato fino in fondo...grazie papà.

INDICE GENERALE

1.0 Introduzione.....	1
1.1 Cenni storici sugli enzimi.....	1
1.2 Caratteristiche generali degli enzimi.....	3
1.2.1 Struttura degli enzimi.....	3
1.2.2 La classificazione degli enzimi.....	5
1.2.3 Flessibilità degli enzimi.....	6
1.2.4 Il complesso enzima-substrato.....	6
1.2.5 Il sito attivo.....	7
1.2.6 La teoria dello stato di transizione.....	10
1.2.7 Catalisi enzimatica.....	12
1.2.8 Andamento dell'attività enzimatica.....	13
1.2.9 Origine degli enzimi.....	16
1.2.10 Applicazione industriale degli enzimi.....	18
1.3 Lisozima.....	20
1.4 Applicazioni del lisozima nel settore alimentare.....	24
1.5 Immobilizzazione enzimatica.....	28
1.5.1 Classificazione dei biocatalizzatori.....	28
1.5.2 Selezione del biocatalizzatore.....	29
1.5.3 Immobilizzazione dei biocatalizzatori.....	30
1.5.4 Tecniche di immobilizzazione dei biocatalizzatori.....	31
1.5.5 Metodi fisici di immobilizzazione.....	32
1.5.6 Metodi chimici di immobilizzazione.....	34
1.5.7 Immobilizzazione covalente su supporto solido.....	35
1.5.8 Gruppi chimici coinvolti nel legame.....	37
1.5.9 Supporti per l'immobilizzazione.....	39
1.5.10 Attivazione dei gruppi funzionali e immobilizzazione.....	42
1.5.11 Modificazioni del supporto dopo l'immobilizzazione.....	42
1.5.12 Vantaggi e svantaggi dell'immobilizzazione.....	43
1.5.13 Aspetti normativi dell'uso degli enzimi immobilizzati.....	45
2.0 Scopo del lavoro.....	47

3.0 Materiali e Metodi.....	48
3.1 Materiali.....	48
3.2 Metodi.....	49
3.2.1 Procedura sperimentale.....	49
3.2.2 Immobilizzazione di HEWL su sfere tosil-attivate (TAB).....	49
3.2.3 Immobilizzazione di HEWL su sfere carbossi-attivate (CB).....	50
3.2.4 Immobilizzazione di HEWL su sfere epossi-attivate (IB).....	51
3.2.5 Determinazione della concentrazione di HEWL nella forma libera ed Immobilizzata.....	52
3.2.6 Determinazione dell'attività di HEWL.....	52
3.2.6.1 Preparazione del substrato.....	52
3.2.6.2 Determinazione dell'attività di HEWL libero in tampone McIlvaine.....	52
3.2.6.3 Determinazione dell'attività di HEWL immobilizzato – batch mode.....	53
3.2.6.4 Studio cinetico di HEWL libero.....	54
3.2.6.5 Analisi statistica.....	54
4.0 Risultati e Discussione.....	55
4.1 Scelta del substrato.....	55
4.2 Determinazione dell'attività di HEWL libero in tampone McIlvaine.....	55
4.3 Determinazione dell'attività di HEWL libero ed immobilizzato in vino modello.....	58
4.4 Determinazione dell'attività di HEWL immobilizzato – batch mode.....	60
4.5 Stabilità di HEWL immobilizzato.....	61
5.0 Conclusioni.....	62
BIBLIOGRAFIA.....	64

1.0 Introduzione

1.1 Cenni storici sugli enzimi

Il termine greco enzima (ένζυμο) significa testualmente “nel lievito” e fu utilizzato per la prima volta nel 1878 dal fisiologo Wilhelm Kühne.

Storicamente i primi enzimi sono stati identificati proprio nel lievito, anche se fin dagli albori della civiltà l'uomo, in virtù dell'esigenza di conservare gli alimenti a sua disposizione e di trasformarli in prodotti più stabili e duraturi nel tempo, li ha impiegati seppure inconsapevolmente. In seguito alla constatazione che il latte rimasto all'interno dello stomaco dei vitelli e degli agnelli macellati era coagulato, ad esempio, si cominciò ad usare il caglio per produrre il formaggio, ma solo molte centinaia di anni dopo si scoprì che questa sostanza è un enzima (Verga e Pilone, 2002).

Il chimico svedese J.J. Berzelius (1835) fu il primo a formulare il concetto di “catalisi enzimatica”, dopo aver osservato che alcune reazioni chimiche procedevano più velocemente in presenza di sostanze capaci di rimanere inalterate. Egli ipotizzò che tali composti esercitassero una "forza catalitica" in grado di provocare una variazione delle affinità chimiche ordinarie tra atomi e molecole. Berzelius scrisse: "...è provato che parecchi corpi semplici e composti solubili ed insolubili, hanno la proprietà di esercitare su un altro corpo un'azione molto differente all'affinità chimica. Per mezzo di questa azione, essi producono in questi corpi decomposizione dei loro elementi ai quali restano estranei" (Minerva, 2007).

Pur nella sua estrema genericità, il punto di vista proposto da Berzelius si dimostrò immediatamente fertile e diede il via ad una serie di studi come quelli che portarono Theodor Schwann (1810-1882) a dimostrare l'esistenza nel succo gastrico di un principio digestivo che chiamò pepsina. Era il 1836, l'anno della pubblicazione in Germania dello *Jahres-Bericht* di Berzelius ed il giovane botanico dimostrò che piccole quantità di pepsina erano in grado di agire su grandi quantità di albumina, avvalorando in tal modo l'ipotesi che l'azione del nuovo principio doveva essere catalitica o di contatto.

Con il trascorrere degli anni le osservazioni su nuovi "principi attivi" si accumularono: Wöhler e Liebig nel 1837 definirono l'esistenza dell'emulsina nelle

mandorle amare, Claude Bernard ottenne la lipasi dal pancreas (1849), Berthelot l'invertasi dal lievito (1856), Kühne la tripsina ancora dal pancreas (1877). A questo punto era necessario dare un nome a queste nuove entità e fu proprio Willy Kühne nel 1878, a scegliere la parola enzima riferendosi ai fermenti non organizzati come l'invertasi, individuati all'interno della cellula del lievito da Louis Pasteur.

La scoperta degli enzimi può essere pertanto vista come una tappa fondamentale nell'ambito della biochimica ed ha gettato le basi per la comprensione di importanti processi fino ad allora inspiegabili, come la digestione della carne operata dai succhi gastrici e la conversione dell'amido in zucchero, anche se inizialmente si riteneva che le dimostrate proprietà degli enzimi fossero strettamente legate alla loro struttura cellulare integra. Solo nel 1897 Eduard Buchner portò a termine presso l'Università di Berlino, degli esperimenti che dimostrarono l'esistenza dell'attività catalitica non solo nelle cellule di lievito integre, ma anche nell'estratto di lievito e definì "zimasi" l'enzima responsabile della fermentazione del saccarosio.

Questi studi valsero a Buchner il Premio Nobel nel 1907 per la chimica, per le ricerche biochimiche e per la scoperta della fermentazione indipendente dalla cellula.

Grazie agli studi di Buchner, l'attenzione degli scienziati dell'epoca si concentrò sulla natura chimica degli enzimi arrivando a mettere in relazione l'attività enzimatica con la struttura proteica, anche se una parte influente della comunità scientifica del primo Novecento, tra cui il Premio Nobel Richard Willstätter, sosteneva che le proteine non fossero altro che semplici trasportatori degli enzimi.

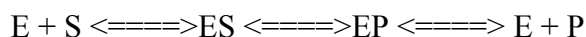
Nel 1926 gli studi sulla cristallizzazione condotti da James Sumner dimostrarono in maniera inconfutabile che l'enzima ureasi era una vera e propria proteina. I successivi lavori di Northrop e Stanley sugli enzimi digestivi pepsina, tripsina e chimotripsina, confermarono definitivamente l'ipotesi di Sumner e i tre ricercatori furono premiati con il Nobel nel 1946 (Wikipedia, 2007).

La scoperta che gli enzimi fossero cristallizzabili diede il via ad una corsa tesa alla definizione delle loro strutture tridimensionali attraverso tecniche come la cristallografia ai raggi X. La prima macromolecola ad essere definita con questa tecnica fu il lisozima, enzima deputato alla digestione della parete batterica e contenuto nelle lacrime, nella saliva, nell'albume. La cristallizzazione enzimatica segnò di fatto l'inizio della biologia strutturale.

1.2 Caratteristiche generali degli enzimi

Gli enzimi sono molecole proteiche aventi il compito di catalizzare praticamente tutte le reazioni chimiche che avvengono negli organismi viventi.

Essi svolgono il loro ruolo con modalità differenti da reazione a reazione, ma in tutti i casi la catalisi procede attraverso la formazione di complessi tra l'enzima ed i reagenti e può essere così schematizzata:



L'enzima si combina con il substrato S e forma il complesso enzima-substrato (ES) che a sua volta si trasforma in EP scindendosi poi in prodotto P ed enzima libero, nuovamente disponibile per reagire con un'altra molecola di S.

Questo processo può avvenire in maniera estremamente rapida: in molti casi una sola molecola di enzima è in grado di trasformare in 1 secondo migliaia di molecole di substrato in prodotto. Basta pensare che la velocità di una reazione catalizzata può essere fino a 10^{14} volte superiore a quella della stessa reazione non catalizzata (Nelson e Cox, 2003).

1.2.1 Struttura degli enzimi

Gli enzimi sono generalmente proteine globulari che in soluzione assumono approssimativamente una conformazione sferica. Il loro peso molecolare può variare da 10000 a milioni di Dalton. Nei casi più semplici la molecola enzimatica è formata da una singola catena polipeptidica contenente un centinaio di residui aminoacidici; in quelli più complessi diverse catene polipeptidiche sono aggregate tra loro.

La disposizione tridimensionale della catena polipeptidica, la cosiddetta struttura terziaria (Fig. 1a), è alquanto specifica ed i singoli residui aminoacidici si trovano in posizioni ben definite che risultano fondamentali affinché l'enzima espliciti la sua specifica attività biologica. La struttura terziaria di una catena polipeptidica appartenente

ad enzimi formati da più catene, costituisce una sottostruttura, in quanto le catene non si compenetrano l'una nelle altre, ma formano delle sottounità indipendenti che si aggregano nella forma oligomerica detta struttura quaternaria (Fig. 1b).



Figura 1a: struttura terziaria.

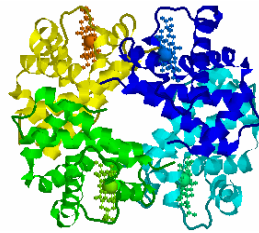


Figura 1b: struttura quaternaria.

Studi di diffrazione ai raggi X di enzimi in forma cristallina, forniscono dettagliate informazioni sulla disposizione degli atomi all'interno di una molecola enzimatica. L'uso di questa tecnica permette di evidenziare le interazioni che si creano tra i gruppi polari e quelli idrofobici responsabili della formazione di zone ordinate all'interno della molecola, e di determinare le interazioni che si instaurano tra l'enzima ed il substrato in virtù della dimostrata origine chimica dell'effetto catalitico.

Alcuni enzimi esplicano la loro funzione di biocatalizzatori utilizzando esclusivamente la reattività chimica dei loro residui aminoacidici, altri richiedono invece la partecipazione di cofattori estranei alla struttura proteica. Questi cofattori sono spesso legati saldamente, anche covalentemente, all'enzima e possono essere ioni metallici come Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} o complesse molecole organiche chiamate coenzimi che agiscono da trasportatori temporanei di specifici gruppi funzionali. Se il cofattore viene rimosso, la proteina assume il nome di apoenzima ed è priva di attività catalitica.

1.2.2 La classificazione degli enzimi

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

Classificazione	Azione
Ossidoreduttasi	Aggiunta o rimozione di atomi di idrogeno da molti gruppi chimici.
Trasferasi	Trasferimento di gruppi funzionali da molecole donatrici a molecole accettrici. Le cinasi sono specifiche trasferasi adibite al trasferimento di un gruppo fosfato.
Idrolasi	Aggiunta di acqua ad un legame con contestuale rottura.
Liasi	Rottura di legami C-C, C-O, C-N ed altri con modalità differenti dall'idrolisi o ossidazione.
Isomerasi	Isomerizzazione cis-trans, cheto-enolica, aldoso-chetoso (isomerasi). Epimerizzazione (epimerasi e racemasi). Trasferimento intramolecolare di gruppi (mutasi).
Ligasi	Formazione di un legame covalente accoppiata alla rottura di un legame ad alto contenuto di energia di idrolisi (sintetasi).

Ciascuna classe funzionale comprende numerose sottoclassi, a loro volta suddivise in sotto-sottoclassi. Secondo il sistema I.U.B, ogni enzima è identificato da quattro numeri: i primi tre individuano rispettivamente classe, sottoclasse e sotto-sottoclasse mentre il quarto caratterizza ogni enzima all'interno della sotto-sottoclasse di appartenenza.

Il nome di un enzima si ottiene indicando il substrato su cui agisce ed il tipo di reazione catalizzata con l'aggiunta del suffisso -asi. Ad esempio l'enzima che catalizza la reazione



normalmente chiamato alcool deidrogenasi, ha il nome I.U.B. di alcool NAD⁺ ossidoreduttasi ed è identificato dai numeri 1.1.1.1 dove il primo 1 è quello della classe funzionale delle ossidoreduttasi, il secondo è quello della sottoclasse che identifica gli enzimi che agiscono sui gruppi CH-OH, il terzo è quello della sotto-sottoclasse che identifica gli enzimi che si servono di NAD o NADP ed il quarto 1 identifica l'enzima all'interno della sotto-sottoclasse.

1.2.3 Flessibilità degli enzimi

Una caratteristica importante degli enzimi è che la loro struttura non è rigida ma flessibile. L'origine di queste proprietà va ricercata nella relativa debolezza delle interazioni idrofobiche e ioniche responsabili della specifica conformazione spaziale delle catene polipeptidiche. L'associazione di residui idrofobici, avviene in quanto questi si sequestrano dall'ambiente acquoso rifugiandosi nelle porzioni interne della molecola, ove i contatti con l'acqua sono minimizzati. Le interazioni ioniche comprendono invece legami salini tra gruppi di carica opposta e legami idrogeno. Quando questi ultimi sono formati tra gruppi della catena polipeptidica esposta all'acqua, i legami idrogeno risultano estremamente instabili e tendono a rompersi molto facilmente per restaurare le originarie interazioni con l'acqua. I legami idrogeno sono invece più stabili se si formano nelle regioni idrofobiche ove non esiste un processo di scambio con l'acqua.

In considerazione della relativa instabilità che caratterizza i legami responsabili della conformazione specifica di una proteina, è ragionevole supporre che la sua struttura non sia fissa, ma che esista in una miscela di forme tautomeriche in equilibrio tra loro. Qualora un substrato si leghi preferibilmente con una sola di queste forme, essa prevarrà sulle altre: in questo caso si parla di un cambiamento strutturale indotto, che si ripercuote di solito positivamente sull'attività catalitica.

1.2.4 Il complesso enzima-substrato

L'idea che il meccanismo chimico della catalisi enzimatica comprenda la formazione di un complesso enzima-substrato, fu suggerita agli inizi del secolo per spiegare il comportamento cinetico dell'invertasi.

La prova diretta dell'esistenza di un simile complesso si è potuta avere solo con l'introduzione di tecniche spettroscopiche: è in questo modo che nel 1943 fu dimostrata l'esistenza di un complesso tra perossidasi ed acqua ossigenata. Da allora tecniche di spettrometria di assorbimento e di fluorescenza sono state utilizzate nello studio di complessi enzimatici che usano coenzimi nucleotidici e flavinici mentre l'introduzione della risonanza magnetica ha segnato una svolta nello studio di complessi di enzimi contenenti ioni metallici. L'isolamento dei complessi enzima-substrato, tuttavia, si è realizzato solo in pochi casi ed in presenza di un legame covalente tra enzima e substrato.

Per comprendere le modalità di azione di un enzima è necessario conoscere non solo la sua struttura allo stato nativo, ma anche le caratteristiche dei complessi formati con il substrato, l'intermedio ed il prodotto. Solo in questo modo è possibile capire quali gruppi catalitici si trovano in prossimità del substrato e quali cambiamenti strutturali si verificano nell'enzima e nel substrato quando vengono a contatto.

1.2.5 Il sito attivo

La maggior parte delle reazioni enzimatiche utilizza substrati che sono di piccole dimensioni se comparati alla molecola dell'enzima. Solo una piccola parte della proteina enzimatica, di conseguenza, si trova a diretto contatto con la molecola del substrato a formare il complesso ES ma queste porzioni del biocatalizzatore giocano un ruolo fondamentale nel processo catalitico: esse costituiscono il così detto sito attivo o catalitico dell'enzima.

Il sito attivo ha una struttura tridimensionale ben definita e spesso è localizzato in una “tasca” della superficie molecolare proteica, dove diversi amminoacidi sono disposti in maniera estremamente precisa. Il resto della proteina enzimatica fornisce una specie di scheletro strutturale che garantisce il mantenimento dei componenti del sito attivo nella conformazione tridimensionale necessaria ad una efficiente e specifica catalisi.

Per effetto della loro struttura peculiare, tutti gli enzimi presentano un'elevata specificità nei confronti del substrato tanto da poter affermare che “esiste un solo enzima per ogni singola reazione metabolica” (Hendrickson *et al.* 1973). Gli enzimi, infatti, non solo sono in grado di discriminare in base all'identità chimica del substrato, ma anche sulla base della sua configurazione geometrica e stereochimica. Ad esempio, se un enzima utilizza come substrato la forma D di uno zucchero, ne consegue che il corrispondente stereoisomero L non sarà oggetto di reazione se non in misura del tutto trascurabile. Questo avviene poiché gli enzimi possono distinguere due gruppi uguali all'interno di una molecola simmetrica in modo da reagire sempre con lo stesso gruppo. E' il caso dell'enzima aconitasi che catalizza la trasformazione dell'acido citrico in cis-aconitico: è sempre il protone del gruppo metilenico che deriva dall'ossalacetico ad essere eliminato (Fig. 2).

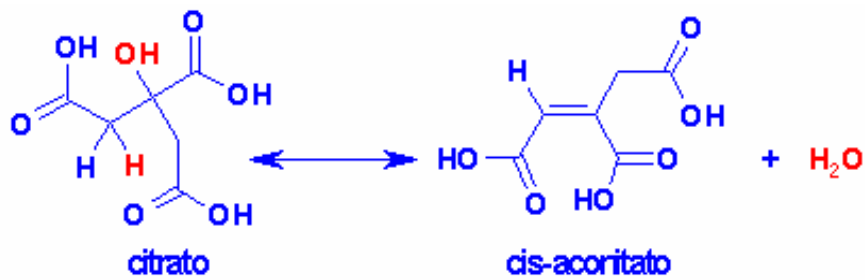


Figura 2: trasformazione dell'acido citrico in cis-aconitico.

Queste osservazioni portano alla conclusione che gli enzimi posseggono siti attivi asimmetrici con molteplici punti di attacco per il substrato. La sintesi asimmetrica del cis-aconitico può essere quindi spiegata se almeno tre dei quattro gruppi sono attaccati sulla superficie dell'enzima (Fig. 3).

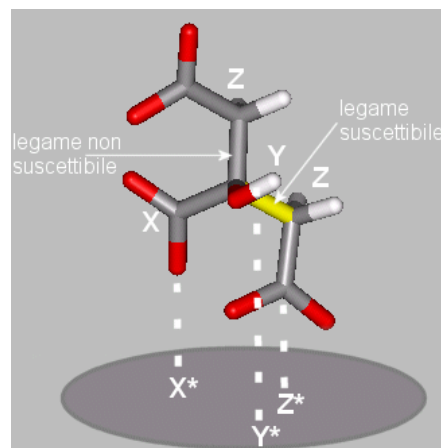


Figura 3: sintesi asimmetrica del cis-aconitico.

Il concetto stesso di specificità richiede che l'enzima e il substrato si adattino l'un l'altro. Nel 1894 Fischer propose la sua "*lock and key hypothesis*" implicante una complementarità tra substrato ed enzima legata a rigide conformazioni molecolari, (Fig. 4).

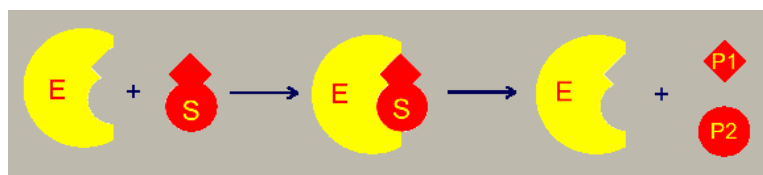


Figura 4: ipotesi della serratura e della chiave.

Questa ipotesi permette di spiegare le interazioni enzima-substrato di un gran numero di enzimi ma risulta di difficile applicazione in presenza di composti chimicamente molto simili al substrato, ma che posseggono gruppi meno voluminosi. In questi casi, anche se in linea teorica questi composti potrebbero facilmente adattarsi allo stampo rappresentato dal sito attivo dell'enzima, spesso le reazioni non si sviluppano o lo fanno con notevole difficoltà. E' il caso ad esempio dell'enzima 5-nucleotidasi che idrolizza il ribosio 5-fosfato ad un centesimo della velocità osservata quando lavora sul suo substrato specifico: l'acido adenilico.

E' sulla base di queste osservazioni che Koshland (1958) dedusse che la più larga struttura del vero substrato è indispensabile per far funzionare l'enzima in maniera completa, in quanto in grado di orientare i gruppi catalitici dell'enzima nella corretta posizione nei confronti dei gruppi reagenti del substrato. L'ipotesi di Koshland è nota con il nome di "ipotesi dell'adattamento indotto" (*induced fit*) e si basa su di una potenziale complementarità tra enzima e substrato, paragonabile a quella esistente tra una mano ed un guanto, più che tra una serratura ed una chiave (Fig. 5a e 5b).

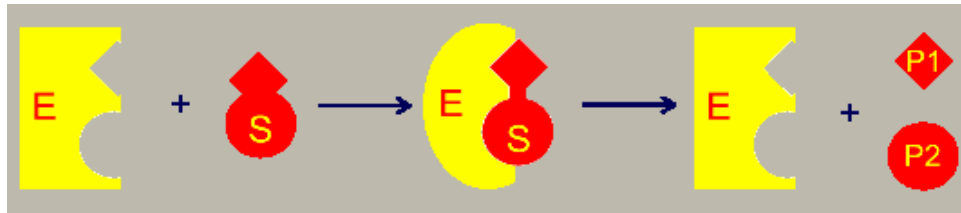


Figura 5a: modello dell'adattamento indotto: enzima e substrato si modificano a vicenda.

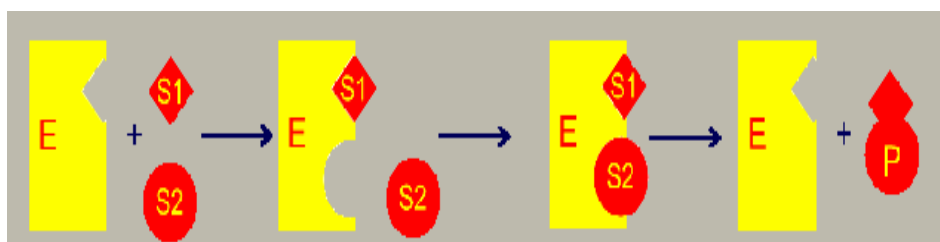


Figura 5b: modello dell'adattamento indotto. In alcune reazioni a due substrati solo il cambiamento conformazionale indotto nell'enzima dal legame con il primo substrato permette al secondo substrato di legarsi.

Una caratteristica specifica della catalisi enzimatica consiste nel fatto che le reazioni avvengono all'interno del complesso enzima-substrato. Per comprendere a pieno il

meccanismo di una reazione enzimatica è di fondamentale importanza conoscere sia la struttura dell'enzima nativo che quella di tutti i complessi che si formano nel corso della reazione. Solo così è possibile arrivare all'identificazione degli aminoacidi coinvolti nel legame con il substrato e di quelli responsabili della catalisi.

La principale difficoltà nello studio dei complessi enzima-substrato sta nel fatto che essi si trasformano velocemente in prodotti ed enzima libero, mentre le tecniche di studio, ad esempio i raggi X, richiedono tempi di acquisizione dati molto più lunghi. Un metodo per produrre complessi stabili è quello di co-cristallizzare enzima e substrato oppure, poiché le proteine cristallizzate non contengono mai meno del 30% di acqua, si possono ottenere complessi per diffusione del substrato all'interno dell'enzima.

La tecnica della differenza di Fourier, che consiste nel misurare le differenze tra i profili di diffrazione dei cristalli nativi e quelli misurati in presenza del substrato, consente di raccogliere le necessarie informazioni sulle alterazioni della struttura secondaria indotte dal legame con il substrato a partire dalle variazioni di densità elettronica riscontrate.

In alcuni casi è stato possibile studiare complessi enzima-substrato in condizioni non reattive ossia in presenza di substrati poco reattivi, pH non ottimale o basse temperature. Tra i vari metodi utilizzati quello che prevede l'attacco covalente di una sostanza al sito attivo, sia essa lo stesso substrato, un intermedio o un composto strutturalmente ad esso correlato ma incapace di reagire, è sicuramente uno dei più utili.

1.2.6 La teoria dello stato di transizione

Una teoria particolarmente utile per affrontare la catalisi e la cinetica chimica in termini di struttura–reattività, è la teoria dello stato di transizione. Questa teoria considera una reazione solo in termini di:

- reagenti che si trovano allo stato energetico fondamentale;
- specie chimiche più instabili presenti lungo le coordinate di reazione allo stato di transizione;
- intermedi;
- prodotti.

Lo stato di transizione corrisponde ad una specie chimica con legami non completamente formati e si situa, nel diagramma di reazione, nel picco più alto. Gli eventuali intermedi sono specie chimiche con legami completamente formati che si collocano in avvallamenti del diagramma (Fig. 6).

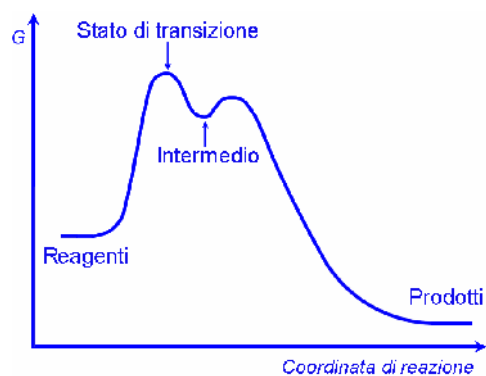


Figura 6: diagramma della coordinata di reazione di una reazione chimica.

La teoria dello stato di transizione non prende in considerazione i processi che coinvolgono i reagenti: in altri termini non si preoccupa dei meccanismi di reazione, ma permette di correlare la velocità di una reazione con la differenza di energia libera di attivazione tra lo stato fondamentale e lo stato di transizione.

Secondo questa teoria la costante di velocità di primo ordine si determina nel seguente modo:

$$K = A \exp(-\Delta G^\ddagger (RT)^{-1})$$

dove A è la costante di Arrhenius, R la costante dei gas e T la temperatura assoluta.

Utile nella comprensione della teoria dello stato di transizione, è il postulato di Hammond secondo il quale se c'è un intermedio instabile, lo stato di transizione gli rassomiglierà e quanto più lo stato di transizione assomiglia al prodotto, tanto più veloce sarà la reazione.

1.2.7 Catalisi enzimatica

Affinché una reazione chimica possa avere luogo è necessario rompere i legami preesistenti e garantire al contempo la formazione di nuovi. La rottura dei legami è generalmente conseguenza delle collisioni che si hanno tra le molecole dei reagenti ma, affinché gli urti siano efficaci si devono verificare due condizioni:

- che gli urti siano numerosi e avvengano, da un punto di vista geometrico, nella direzione giusta;
- che le molecole reagenti posseggano energia sufficiente a causare la rottura dei legami esistenti.

L'energia necessaria a generare urti efficaci si definisce energia di attivazione ($\Delta G^\ddagger$).

Gli enzimi sono in grado di aumentare enormemente la velocità di una reazione permettendo di raggiungere l'equilibrio in un intervallo di tempo molto più breve rispetto a quello necessario in loro assenza. L'aumento della velocità di reazione dipende dal fatto che l'enzima abbassa l'energia di attivazione formando uno stato di transizione caratterizzato da un minor contenuto energetico rispetto a quello che si aveva in assenza del biocatalizzatore (Fig. 7). Contemporaneamente l'enzima avvicina i reagenti, favorisce il loro contatto ed orienta i gruppi che devono interagire, facilitando la rottura dei legami preesistenti e la formazione dei nuovi.

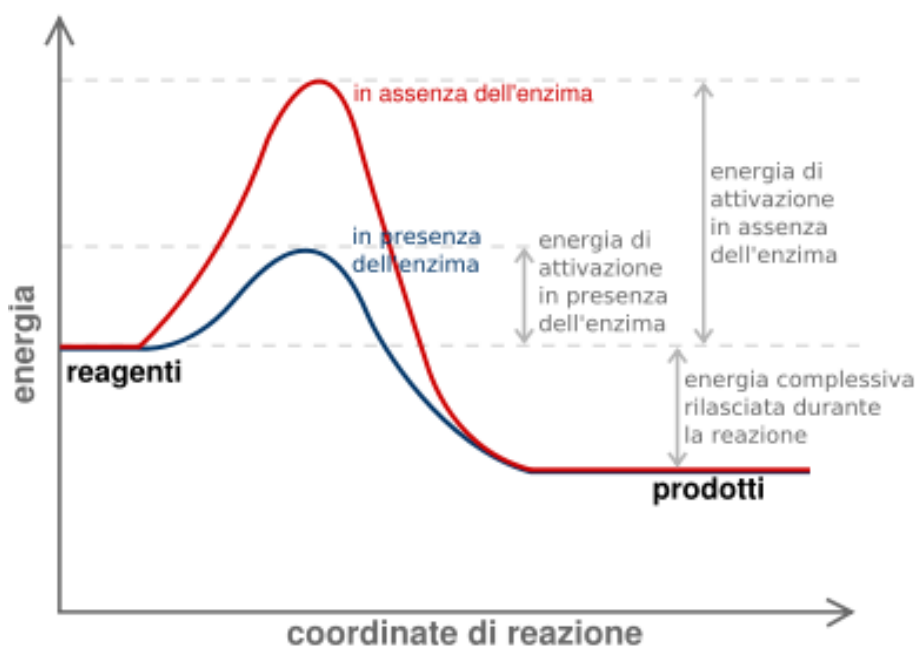


Figura 7: confronto fra l'energia di attivazione in presenza ed in assenza dell'enzima.

La maggior parte delle reazioni biologiche catalizzate da enzimi hanno una velocità superiore di milioni di volte alla velocità che avrebbero senza alcun catalizzatore.

1.2.8 Andamento dell'attività enzimatica

La velocità di una reazione catalizzata è influenzata dai seguenti fattori:

Concentrazione del substrato

La velocità di una reazione enzimatica in funzione di differenti concentrazioni di substrato varia così come mostrato dalla curva di figura 8. A parità di altre condizioni si osserva che, inizialmente, essendo gran parte dell'enzima libero la velocità della reazione, cioè la quantità di prodotto che si forma nell'unità di tempo, è direttamente proporzionale alla concentrazione del substrato come mostra il tratto inizialmente rettilineo della curva.

Una volta raggiunta una certa concentrazione, però, quando tutte le molecole di enzima risultano impegnate nel complesso ES, ogni ulteriore aumento di substrato non fa più crescere linearmente la quantità di prodotto. La velocità della reazione si stabilizza su un valore massimo di conversione in prodotto e non è più condizionata da altra aggiunta di substrato. La velocità massima si raggiunge nel momento in cui l'enzima è saturato dal substrato, ovvero quando il numero delle molecole di enzima risulta uguale al numero delle molecole del complesso enzima-substrato.

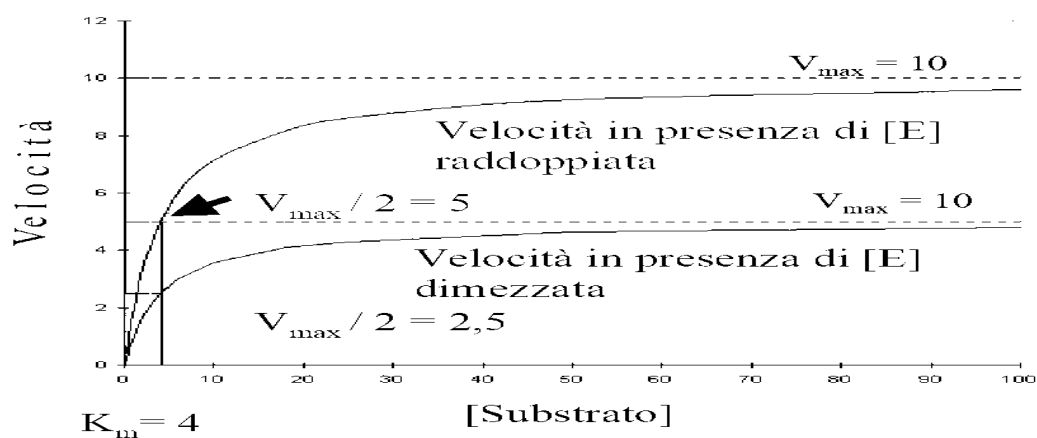


Figura 8: velocità di una reazione enzimatica in funzione di differenti concentrazioni di substrato.

Concentrazione dell'enzima

La velocità massima di una reazione enzimatica è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima: in presenza di una concentrazione alta di substrato, ogni molecola di enzima è legata ad una molecola di substrato ed aumentando la concentrazione dell'enzima, aumenta anche la formazione del prodotto. Pertanto se ad esempio si raddoppiano le molecole di enzima impiegato, legando queste il doppio delle molecole di substrato, si raddoppierà anche la velocità di reazione. Il grafico di figura 9 che mette in relazione $[E]$ contro V sarà, pertanto, una retta.

Nell'ambiente cellulare l'enzima, di solito, è presente in concentrazione molare molto minore di quella del substrato. La figura 8 mostra anche come K_m è indipendente dalla concentrazione dell'enzima e da quella del substrato. Riducendo del 50% la $[S]$, la V_{max} scende in proporzione, ma il valore di $[S]$ a $V_{max}/2$ resta sempre lo stesso.

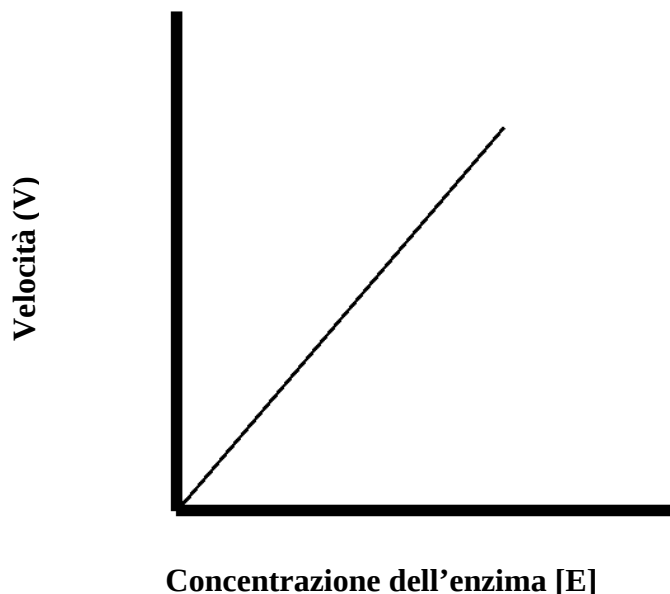


Figura 9: relazione tra concentrazione dell'enzima e velocità della reazione catalitica.

Temperatura

La velocità delle reazioni enzimatiche varia col crescere della temperatura secondo il grafico a campana riportato in figura 10. Si può osservare che, inizialmente, come avviene per tutte le reazioni chimiche all'aumentare della temperatura la velocità

aumenta, raggiunge un massimo in corrispondenza di una certa temperatura definita ottimale, per poi ridursi a causa della denaturazione dell'enzima. Se le variazioni di temperatura si allontanano di poco dalla temperatura ottimale, l'attività massima del biocatalizzatore si ripristina nel momento in cui si riporta la temperatura al valore ottimale ma se ci si allontana troppo dal valore ottimale, la proteina si denatura e l'attività enzimatica cessa.

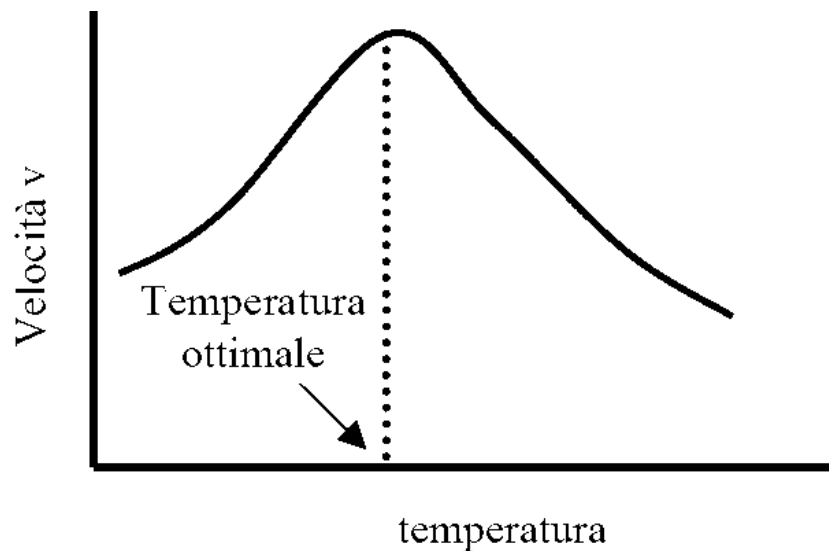


Figura 10: andamento della velocità della reazione enzimatica in funzione della temperatura.

pH

La variazione del pH influenza in modo un po' più complesso della temperatura la velocità delle reazioni enzimatiche. Anche in questo caso, la curva presenta un andamento a campana (Fig. 11) e l'attività enzimatica manifesta un massimo in corrispondenza di un valore definito "pH ottimale" che dipende dalla natura e dalla concentrazione del substrato.

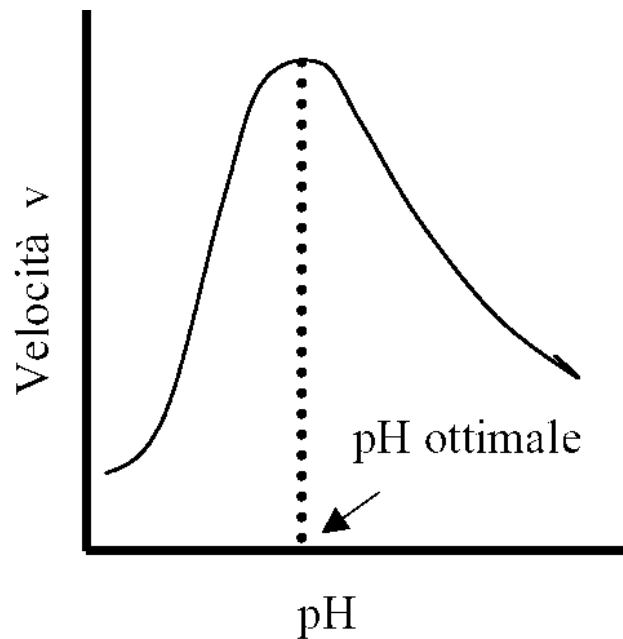


Figura 11: andamento della velocità della reazione enzimatica in funzione del pH.

Data la differenza nella distribuzione delle cariche sulle molecole del substrato e sull'enzima, gli effetti delle variazioni del pH in prossimità del valore ottimale sono generalmente reversibili. Tuttavia, se ci si sposta troppo verso la parte acida od alcalina lungo la scala di pH, l'attività massimale non può più essere ripristinata quando si riporta il pH al suo valore ottimale.

1.2.9 Origine degli enzimi

Da migliaia di anni l'uomo utilizza gli enzimi per conservare i cibi. Inizialmente il loro impiego presupponeva l'uso di microrganismi vivi ottenuti da fonti di origine animale e vegetale (Ratlegde e Kristiansen, 2004) ma con il passare del tempo sono stati introdotti sistemi che permettono la produzione su larga scala di una grande varietà di questi catalizzatori.

Ancora oggi, tuttavia, il caglio, la pepsina, la tripsina e la chimosina, sono le principali fonti di origine animale di alcuni enzimi le cui caratteristiche possono però variare notevolmente in funzione della razza, dal tipo di allevamento, dell'età e delle condizioni degli animali prima della macellazione (tabella 1).

Tabella 1: enzimi da fonti animali.

Fonte	Enzima
Vitello, bovino, capretto, agnello, maiale	Diastasi, esterasi pregastrica, lipasi, pepsina, tripsina, fitasi, chimosina, fosfolipasi
Uova di gallina	Lisozima
Urina umana	Urochinasi

Gli enzimi ricavati dalle piante agricole, invece, sono in genere caratterizzati da una notevole uniformità che si ottiene impiegando sistemi colturali controllati. Fonti eccellenti di proteasi sono l'ananas da cui si estrae la bromelina, la papaia da cui si ottiene la papaina e il fico da cui si ricava la ficina (tabella 2).

Tabella 2: enzimi da fonti vegetali.

Fonte	Enzima	Applicazione
Fagioli (<i>Canavalia ensiformis</i>)	Ureasi	Diagnostica
Papaia (<i>Carica papaya</i>)	Papaina	Cottura al forno, latticini
Fico (<i>Ficus carica</i>)	Ficina	Inteneritore di carne
Ananas (<i>Ananas comosus</i>)	Bromelina	Cottura al forno
Rafano (<i>Armoracia rusticana</i>)	Per ossidasi	Diagnostica
Mandorla (<i>Amygdalus communis</i>)	β -glucosidasi	Ricerca
Grano (<i>Triticum aestivum</i>)	Esterasi	Idrolisi e sintesi di esteri
Orzo (<i>Hordeum vulgare</i>)	β -amilasi	Cottura al forno, sciroppo di maltosio
Soia (<i>Glycine max</i>)	β -amilasi	Cottura al forno, sciroppo di maltosio

Attualmente la fonte enzimatica più conveniente è rappresentata dai microrganismi. Per ogni genere conosciuto esiste una quantità impressionante di specie e varietà molte delle quali note nell'ambito industriale. Basti ricordare lieviti come: *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Candida utilis*, *Candida antartica* o batteri quali *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* e *Pseudomonas fluorescens*.

Diffusi in qualsiasi tipo di ambiente, i microrganismi presentano una straordinaria varietà nel loro corredo enzimatico. Anche all'interno di un solo tipo di enzima, esistono numerose variazioni di tipo strutturale, di affinità, stabilità, pur catalizzando la medesima reazione. Vale la pena ricordare, ad esempio, come molte specie di *Pseudomonas* siano in grado di utilizzare parecchie decine di fonti di carbonio per il proprio metabolismo, compresi composti aromatici quali benzene e toluene.

Tale adattabilità è portata agli estremi in microrganismi denominati “estremofili”. Questi sono in grado di prosperare in ambienti a prima vista improponibili quali le profondità oceaniche, le pozze calde sulfuree, i territori antartici e le profondità terrestri. Scientificamente queste scoperte hanno prodotto innumerevoli vantaggi a livello industriale. Gli estremofili infatti possono fornire enzimi in grado di operare in condizioni non permesse ad altri e quindi più ampie.

Il grafico riportato in figura 12 esprime in termini percentuali l'importanza delle principali fonti biologiche di enzimi. La scelta dell'una rispetto all'altra,

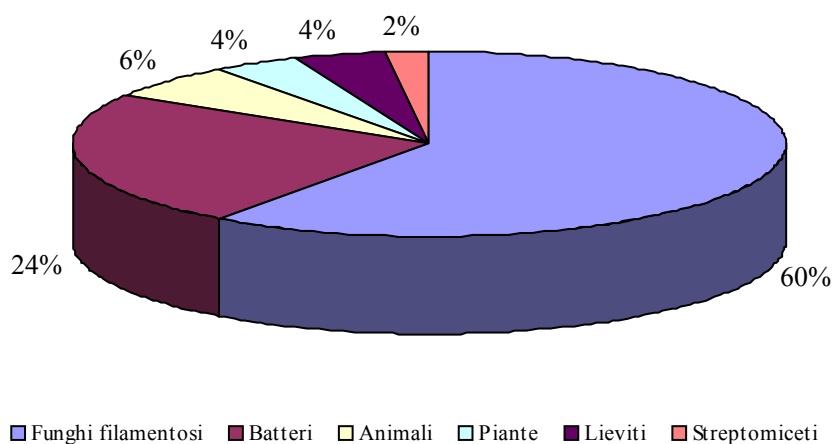


Figura 12: principali fonti biologiche di enzimi.

presuppone una serie di considerazioni che permettono la selezione di poche specie in grado di fornire la proteina di interesse in modo da soddisfare le condizioni richieste in termini qualitativi e quantitativi. E' necessario dapprima valutare se l'enzima ha una distribuzione ubiquitaria o se è presente solo in poche specie: in quest'ultimo caso la scelta è obbligata mentre in caso contrario occorre individuare le fonti che presentano contenuti più alti di enzima, il quale a sua volta deve avere parametri cinetici adeguati alla reazione che dovrà catalizzare.

1.2.10 Applicazione industriale degli enzimi

Gli enzimi sono oggi utilizzati nella maggior parte dei settori industriali entrando a far parte del nostro quotidiano. La produzione mondiale degli enzimi ha registrato un boom

negli anni '60 a seguito dell'introduzione della tecnica della fermentazione e più recentemente come conseguenza della sempre maggiore attenzione rivolta al settore dell'ingegneria genetica.

L'applicazione delle strategie biotecnologiche basate sull'utilizzo degli enzimi, del resto, riveste un ruolo sempre più importante nel settore industriale tanto che negli ultimi 10 anni si è registrato un aumento del 12% nel volume degli enzimi prodotti, con una crescita di tipo esponenziale.

In prospettiva futura si presume che questa tendenza si accentuerà sempre di più sia per la facilità con la quale ormai si operano le manipolazioni genetiche, che per la grande varietà di nuovi enzimi ottenuti da microrganismi tipici di ambienti estremi, in grado di sostituire quelli di origine animale e vegetale.

Il mercato mondiale degli enzimi supera oggi 1,5 miliardi di dollari di fatturato ed è gestito da circa 400 società: 14 di queste sono considerate i maggiori produttori. Il 60% degli enzimi messi in commercio sono realizzati in Europa, il 15% in USA ed il restante 15% in Giappone.

A livello industriale gli enzimi trovano applicazione in numerosi settori: tessile, farmaceutico, chimico, cosmetico, ma anche nell'industria della carta, per il trattamento di reflui e nel campo dell'analisi ambientale e medica. Il 75% degli enzimi industriali sono impiegati nei processi di idrolisi e depolimerizzazione di sostanze complesse naturali con una dominanza delle proteasi utilizzate nei detersivi e nell'industria lattiero-casearia.

Il settore alimentare, del resto, è quello che presenta il maggior impiego di enzimi in applicazioni che vanno dalla trasformazione dell'amido in glucosio e fruttosio, alla produzione di formaggio, vino, birra e succhi di frutta, per passare alla cottura al forno e all'aromatizzazione degli alimenti.

1.3 Lisozima

Il lisozima è un enzima ben noto per le sue proprietà antimicrobiche. E' un enzima ampiamente presente in vari fluidi e tessuti biologici quali uova, piante, batteri, secrezioni animali come saliva, lacrime, latte, secrezioni respiratorie e cervicali, ed è secreto da leucociti polimorfonucleari in diversi tessuti animali e vegetali. La più alta concentrazione è presente nell'albume d'uovo (Proctor e Cunningham, 1988).

Il lisozima appartiene ad una classe di enzimi la cui azione antimicrobica si esplica con la lisi della parete cellulare di alcuni batteri Gram-positivi rompendo il legame tra *N*-acetilglucosamina e l'acido *N*-acetilmuramico del peptidiglicano che costituisce la parete cellulare dei batteri Gram-positivi.

Accanto all'attività antimicrobica, il lisozima ha molte altre funzioni che riguardano l'inattivazione di certi virus (Hasselberg FX, 1978), importanti ruoli nella sorveglianza di membrane delle cellule mammarie (Osserman *et al.*, 1974), aumenta l'attività patogenica dei leucociti polimorfonucleari e macrofagi (Kokoshis *et al.*, 1978; Thakur *et al.*, 1999) e stimola la proliferazione e le funzioni antitumorali dei monociti (Lemarbe *et al.*, 1981).

Il lisozima di origine animale e quello estratto dall'albume d'uovo di gallina (EC 3.2.1.17), in particolare, è stato ampiamente studiato negli anni recenti. Questi studi sono culminati nella determinazione della sequenza primaria.

Il lisozima di origine animale o tipo-C è definito 1,4- β -*N*-acetilmuramidasi. Quest'enzima, selettivamente, rompe il legame glicosidico tra il C-1 dell'acido *N*-acetilmuramico (NAM) e l'O-4 dell' *N*-acetilglucosamina (NAG) del peptidoglicano che costituisce in percentuale più o meno variabile la parete cellulare dei batteri.

La migliore caratterizzazione dei membri appartenenti alla famiglia del lisozima tipo-C è quella del lisozima estratto dall'albume d'uovo di gallina (HEWL). La sequenza primaria completa di questa molecola è stata determinata con tecniche di sequenza proteica e di DNA. Coerentemente agli altri lisozimi tipo-C, HEWL è composto da 129 residui aminoacidici (Jolles e Jolles, 1984).

La struttura terziaria di HEWL è stata inizialmente determinata con risoluzione a 2 Å (1 Å = 0.1 nm) mediante analisi cristallografica di un cristallo a forma tetragonale dell'enzima (Blake *et al.*, 1965; Blake *et al.*, 1967). Successivamente, la struttura di HEWL è stata determinata da cristalli di varia forma e a varie condizioni di temperatura e di pressione (Hodsdon *et al.*, 1990; Moult *et al.*, 1976).

Tutti questi studi indicano che, nonostante le diverse condizioni di sviluppo del cristallo enzimatico, la conformazione del lisozima è essenzialmente identica. La struttura tridimensionale del lisozima è mostrata in figura 13. Una profonda crepa, contenente il sito attivo dell'enzima divide la molecola in due domini; uno di questi presenta, quasi interamente, una struttura β -sheet (comprendente i residui dal 40 a 85), mentre l'altra parte dell'enzima è costituita dai segmenti N- e C-terminali (residui da 1 a 39 e da 101 a 129) ed è di natura elicoidale. I due domini sono uniti da un elica di tipo α (residui da 89 a 99).

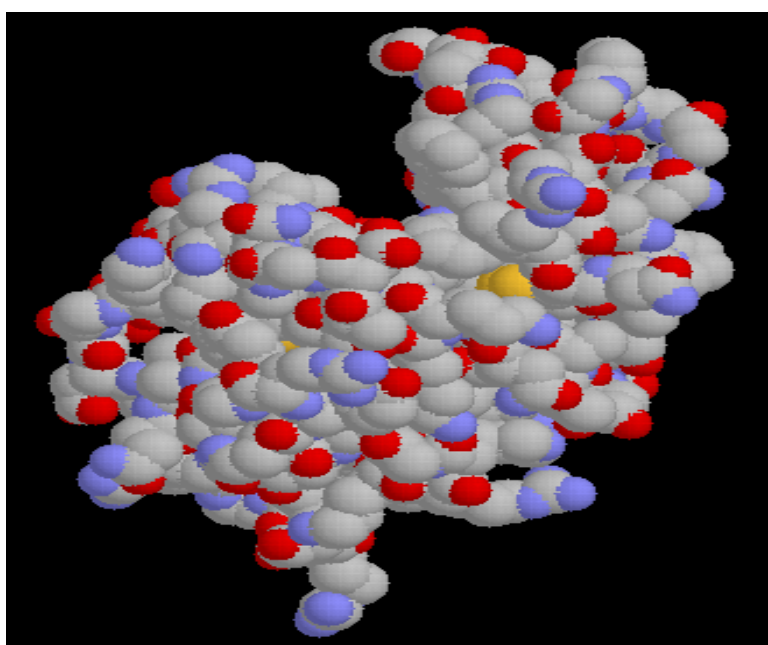


Figura 13: rappresentazione stereografica di HEWL.

Il meccanismo di reazione di HEWL correntemente accettato, spesso generalmente chiamato catalisi acida, fu inizialmente proposto da osservazioni ottenute attraverso il modello dei substrati di polisaccaride nel sito attivo dell'enzima.

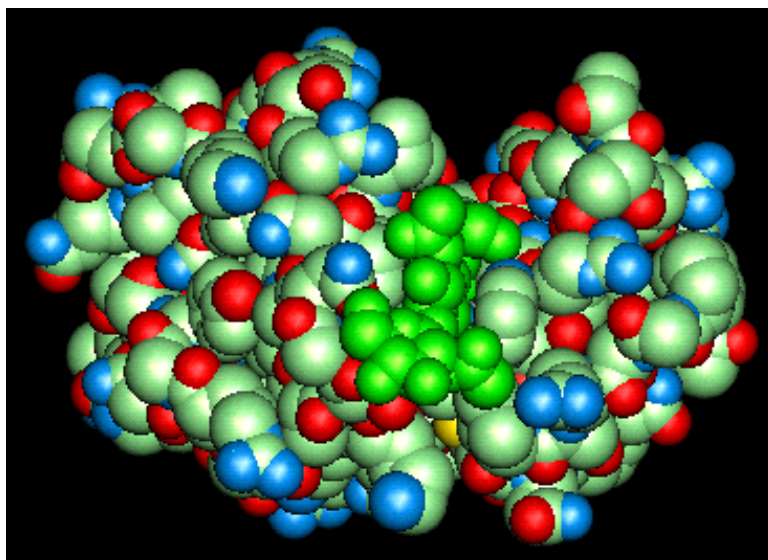


Figura 14: il trisaccaride (NAG)₃ evidenziato in verde scuro si lega fortemente al sito attivo. La cristallizzazione di (NAG)₃ legato all'enzima indica la posizione del sito attivo dell'enzima.

La struttura cristallina, mostrata in figura 14, può contenere più di tre molecole di NAG per occupare interamente l'intera crepa in cui è situato il sito attivo dell'enzima. Modelli-leganti suggeriscono che tale sito può contenere fino a sei monosaccaridi di un substrato. Questa proposta fu supportata da successivi lavori i quali dimostrarono che la struttura del substrato delle pareti cellulari di alcuni batteri è certamente costituita da un esasaccaride costituito da un'alternanza di NAG e NAM.

Inoltre, si è osservato che la massima attività litica di HEWL avviene quando si utilizzano (NAG-NAM)₃ o (NAG)₆ come substrati di reazione.

Le prime pubblicazioni offrirono la prospettiva di dettagliate illustrazioni in merito al meccanismo enzimatico a livello molecolare. Dato che i meccanismi necessitano di alcune delle più valide relazioni tra “struttura” e “funzione”, gli enzimi devono riconoscere e quindi stabilizzare stati di transizione che, probabilmente, durano solo femtosecondi (10^{-12} s).

In vivo il lisozima catalizza la lisi di polisaccaridi del peptidoglicano accelerando enormemente l'idrolisi del legame glicosidico C-O indicato con un asterisco in figura 15.

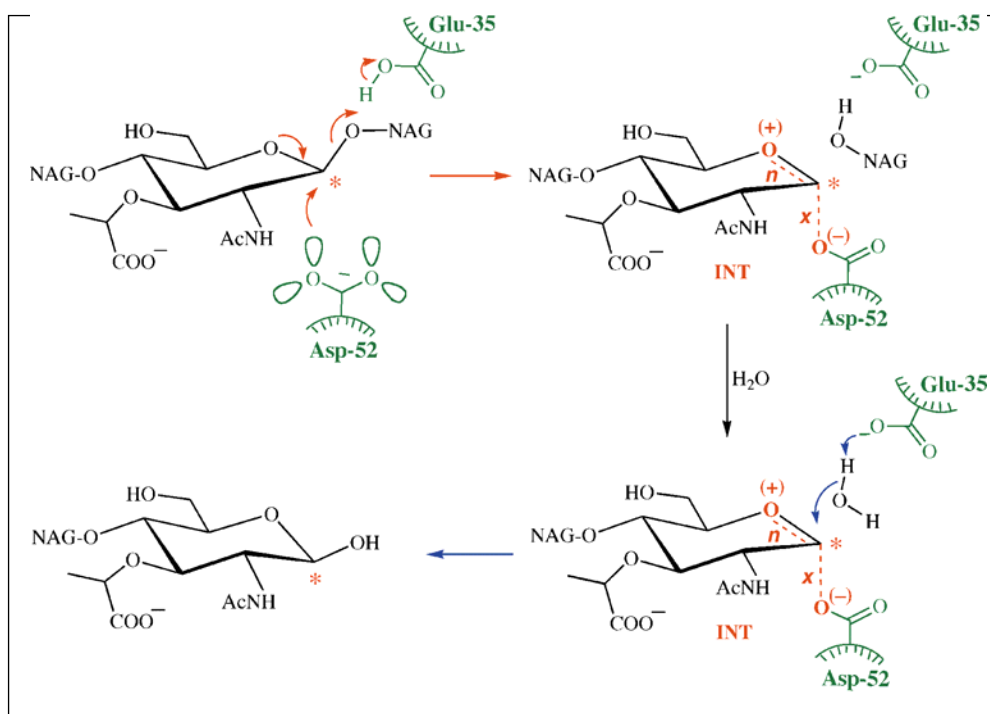


Figura 15: la reazione catalizzata dal lisozima. Il substrato è legato in modo tale che l'ossigeno facente parte del gruppo uscente, il gruppo 4-OH di un residuo NAG, sia protonato per legarsi al gruppo carbossilico COOH di GLU 35. I gruppi sugli enzimi sono colorati in verde, i movimenti elettronici ed i legami in rosso. Soltanto uno dei legami *exo* e *endo* (*x* and *n*) dell'intermedio è attualmente presente.

L'enzima agisce sul legame C-O del substrato rompendolo mediante l'utilizzo di 2 gruppi catalitici, Glu 35 e Asp 52. In pratica, anche in questo favorevole caso in cui la disposizione tridimensionale dei gruppi reattivi è stata ampiamente definita, i meccanismi di reazione sono stati solo recentemente illustrati (Kirby, 2001).

L'incertezza scientifica nel caso del lisozima riguarda la formazione del legame al centro glicosidico reagente. La reazione di rottura termina con ritenzione di configurazione al centro glicosidico in quanto la molecola d'acqua si lega sullo stesso lato di NAM che era occupato da NAG. Un meccanismo di reazione SN_2 non porta a ritenzione di configurazione, per cui il meccanismo globale di reazione è costituito da due passaggi e, quindi, un intermedio di reazione.

Il meccanismo è un doppio spostamento in cui il gruppo carbossilico di Asp 52 al primo step agisce da nucleofilo per formare l'intermedio di reazione glicosil-enzima che, trattandosi di una reazione di tipo SN_2 comporta un'inversione di configurazione. L'enzima carbossilato è quindi spostato nel secondo step di reazione da una molecola

d'acqua. Questa seconda inversione restituisce l'originale configurazione al carbonile del gruppo glicosidico reagente.

1.4 Applicazioni del lisozima nel settore alimentare

Il lisozima ha elevate potenzialità per la preservazione degli alimenti data la sua stabilità in un ampio spettro di pH e di temperatura. La sua limitata efficacia antimicrobica nei confronti dei batteri Gram-negativi, tuttavia, ne restringe le sue applicazioni nel settore alimentare. Masschalck e Michiels (2003) recentemente hanno rielaborato differenti metodi per estendere lo spettro antimicrobico ai batteri Gram-negativi, includendo la denaturazione del lisozima, modificazioni mediante attacco di altri composti al lisozima e l'uso di agenti membrane-permeabilizzanti con il lisozima. Alcuni studi hanno dimostrato che lo spettro d'attività antimicrobica del lisozima potrebbe aumentare quando il suo utilizzo è abbinato ad altre sostanze, come perossido di idrogeno ed acido ascorbico (Miller, 1969), acido etilendiaminotetra-acetico (EDTA) (Padgett *et al.*, 1998), acido caffeico (Valenta *et al.*, 1998), e chitosano (Song *et al.*, 2002).

Il lisozima è un enzima con attività battericida utile nel controllare fermentazioni batteriche nel settore alimentare. È efficace contro i batteri Gram-positivi, tra cui i batteri lattici (LAB). Infatti è utilizzato da più di 20 anni nel settore lattiero-caseario come bioprotettivo per prevenire il gonfiore tardivo, che si manifesta mediante il rigonfiamento dei formaggi a pasta dura e semi-dura ad opera del *Clostridium tyrobutyricum* (Carini *et al.*, 1985).

Applicazioni del lisozima nel settore enologico

Il processo di vinificazione comprende, essenzialmente, due fasi biologiche: la fermentazione alcolica compiuta da lieviti a cui può seguire, nella produzione di alcune tipologie di vini, la trasformazione dell'acido malico in acido lattico ad opera di batteri acido-lattici.

La fermentazione malolattica (MLF), definita come una fermentazione secondaria, consiste nella conversione di *L*-(-)-malato a *L*-(+)-lattato e CO₂. In generale, i gruppi

carbossilici del malato sono sostituiti con solo un gruppo presente nel lattato che porta ad una diminuzione dell'acidità del vino.

La MLF nel vino è auspicabile per tre motivi: (i) per diminuire l'acidità; (ii) per migliorare le caratteristiche organolettiche; e (iii) per aumentare la stabilità microbiologica del vino. Comunque, non è un processo fermentativo utile a tutti i vini. Se ne giovano, generalmente, i vini rossi ed i bianchi prodotti da uve ad elevata acidità (in aree più fredde) (Davis *et al.*, 1985). Quindi, una buona conoscenza della MLF è essenziale per il controllo (stimolare od inibire) di quest'importante processo.

I batteri malolattici (Carme Masque e Bordons, 1996; Edwards, 1992; Izuagbe, *et al.*, 1985) appartengono a tre generi ed includono lattobacilli omo- ed eterofermentativi (*Lactobacillus*), pediococchi omofermentativi (*Pediococcus*) e le specie eterofermentative di *Leuconostoc oenos*, recentemente riclassificato *Oenococcus oeni*, (Dicks *et al.*, 1995).

Oltre all'acido malico, alcuni batteri eterofermentativi, tra cui *Oenococcus oeni*, degradano l'arginina, che risulta quantitativamente uno dei più importanti aminoacidi presente nelle mosto e nel vino. La completa degradazione dell'arginina avviene via ADI pathway portando alla produzione di ammonio, ornitina, ATP e CO₂ (Liu *et al.*, 1996). Durante la degradazione dell'arginina si osserva la secrezione di citrullina. La degradazione dell'arginina ha diverse implicazioni: la produzione di ammonio aumenta il pH ed il rischio di crescita da parte di microrganismi degradanti; la formazione di ATP comporta un vantaggio ecologico ai batteri malolattici; la secrezione di citrullina è un aspetto tossicologico, dato che la citrullina è un precursore nella formazione del carcinogeno EC (uretano) nel vino (Zimmerli and Schlatter, 1991).

Anche l'acido citrico viene metabolizzato da *Oenococcus oeni*. Uno dei composti intermedi nel metabolismo dell'acido citrico è il diacetile, che è considerato uno più importanti flavour prodotti durante MLF. Quando è presente in quantità superiori alla sua soglia di percezione, il diacetile dona al vino aroma di burro. E' stato dimostrato che i valori soglia in diversi vini variano da 0.2 mg mL⁻¹ nel vino Chardonnay a 0.9 mg mL⁻¹ nel Pinot nero e 2.8 mg mL⁻¹ nel vino Cabernet Sauvignon. La fonte del diacetile è l'acido α -acetolattico, un composto instabile che accanto alla decarbossilazione enzimatica dei batteri può anche decarbossilare spontaneamente ad acetoino e, in condizioni ossidanti, a diacetile. Il diacetile, inoltre, è ridotto da *Oenococcus oeni* ad acetoino e 2,3-butandienolo, che in concentrazioni normali non influenza l'aroma del vino (Nielsen and Richelieu, 1999). Comprendere l'insieme dei fattori coinvolti nel processo di fermentazione malolattica è un punto critico per il controllo del flavour finale del vino.

Sebbene molte specie di batteri lattici siano presenti nel mosto d'uva, avviene una selezione naturale attraverso la fermentazione alcolica, ed *Oenococcus oeni* diviene la specie dominante tra quelle che sono in grado di condurre una MLF (Lonvaud-Funel A, 1999). Durante la vinificazione *Oenococcus oeni* è la specie di batterio acido-lattico che più frequentemente è associato alla fermentazione malolattica. I risultati della fermentazione spontanea ed indotta, che sono dovuti rispettivamente a ceppi indigeni e starter commerciali, sono dipendenti dalla densità cellulare nel vino. Certamente, popolazioni batteriche prossime a 10^6 - 10^7 CFU mL⁻¹ sono considerate appropriate per iniziare una significativa degradazione dell'acido malico; ma d'altro canto, lo sviluppo cellulare di *Oenococcus oeni* può qualche volta richiedere diverse settimane in base alle diverse condizioni di sviluppo e alle caratteristiche fisico-chimiche del vino (es. temperatura, pH, SO₂ e concentrazione alcolica) e non sempre una fermentazione malolattica spontanea si sussegue. Di contro, sebbene gli starter malolattici inoculati ad alte densità cellulari nel vino possono provvedere ad un adeguato consumo di acido malico, questi, spesso, non vi riescono a causa della bassa sopravvivenza nel vino. Ragion per cui, dato che il controllo della fermentazione malolattica risulta difficile da prevedere, la conoscenza della densità cellulare di *Oenococcus oeni* durante la vinificazione è un punto critico da valutare.

Oenococcus oeni è certamente il microrganismo che meglio si adatta alle aggressive condizioni del vino ma può accadere che la sua crescita sia inibita o si arresti. Questo problema è riconducibile alla naturale composizione del vino (pH basso e presenza di etanolo), alla sua temperatura (minima 18 °C) e alla presenza di molecole tossiche o con azione inibente; come ad esempio acidi grassi liberi (gli acidi decanoico e dodecanoico sono potenti inibitori di crescita per i batteri acido-lattici), acidi fenolici ed ellagitannini (Bourdineaud *et al.*, 2003). Per questo motivo, un'approfondita conoscenza delle condizioni di adattamento e resistenza di *Oenococcus oeni* ai fattori di stress per lo sviluppo del batterio stesso, richiede una profonda valutazione da parte dell'enologo.

In aggiunta ai batteri acido-lattici indigeni, naturalmente presenti nel vino, colture starter di *Oenococcus oeni* sono, frequentemente, utilizzate per indurre la fermentazione malolattica.

Differenze tra ceppi di colture starter sono relative alla loro resistenza agli stress di crescita. L'esposizione a leggeri stress può portare ad un aumento di resistenza a successive esposizioni, sia nei confronti di forme più estreme dello stesso tipo di stress

che nei confronti di altri tipi di stress. Questi fenomeni si riferiscono all'acquisizione di stress-resistenza e cross-protection.

La scelta di un ceppo stress-tollerante, così come la procedura specifica di preparazione usata per la produzione commerciale della coltura liofilizzata starter, può quindi influenzare il grado di vitalità, così come i risultati della successiva fermentazione.

E' stato osservato che un trattamento acidico permette di ottenere un successivo incremento nella tolleranza ai solfiti da parte di *Oenococcus oeni* (Guzzo *et al.*, 1998).

Negli ultimi anni, molti batteri malolattici sono stati isolati e preparati commercialmente per l'induzione di fermentazioni malolattiche nei vini.

L'attività batterica nei mosti e nei vini è tradizionalmente controllata mediante l'uso di anidride solforosa, un additivo che garantisce funzionalità multiple (antiossidanti, antimicrobiche, estrattive) insieme ad effetti indesiderabili riconducibili alla sua tossicità e allergenicità. Altri additivi antimicrobici come acido sorbico e dimetil-carbonato sono attivi contro i lieviti ma hanno limitata efficacia contro i batteri.

Il lisozima è stato recentemente accreditato nel controllo dell'attività batteriologica nei vini.

Diversi studi che riguardano l'uso di lisozima per regolare o inibire la fermentazione malolattica (MLF) (Pilatte *et al.* 2000) e l'impatto di alcuni fattori di vinificazione hanno dimostrato che i batteri responsabili della fermentazione malolattica nel vino sono sensibili all'azione litica del lisozima (Gerbaux *et al.*, 1999).

La sensibilità dei batteri al lisozima dipende dalla struttura del peptidoglicano nella parete cellulare. L'attività antimicrobica del lisozima nei confronti dei batteri lattici è stata ampiamente studiata (Cunningham *et al.*, 1991) ed è stato dimostrato che dipende dallo stato fisiologico delle cellule e dalla struttura dell'enzima nel mezzo (pH, composti reagenti).

Dal punto di vista delle applicazioni pratiche in enologia, dovrebbe essere istruttivo comprendere la variabilità del lisozima in ceppi batterici che causano spoilage nel vino come ad esempio i batteri appartenenti al genere *Lactobacillus*, il quale è implicato nella formazione di difetti nei mosti e nei vini.

Alcuni studi (Gerbaux *et al.*, 1997) hanno dimostrato una generale sensibilità dei batteri lattici del vino al lisozima in concentrazioni di 250-500 mg mL⁻¹.

Il fattore primario che è stato osservato influenzare l'attività batteriolitica del lisozima nel vino riguarda i componenti polifenolici che potrebbero legarsi all'enzima. Infatti, è stato osservato che il lisozima è più attivo nei vini bianchi rispetto ai rossi.

Al diminuire del pH, l'attività antimicrobica dell'anidride solforosa aumenta. Il fenomeno opposto si osserva per il lisozima, ciò porta l'enzima ad essere un ottimo candidato per prevenire deterioramento nei vini ad elevato valore di pH.

1.5 Immobilizzazione enzimatica

La biocatalisi costituisce una delle principali applicazioni degli enzimi e consente la conversione del substrato nel prodotto voluto, attraverso un numero limitato di tappe enzimatiche.

Tra le molteplici opportunità d'impiego dei catalizzatori biologici, oltre alle classiche reazioni idrolitiche e di isomerizzazione, recentemente sono state introdotte: la sintesi di composti chirali, l'inversione di reazioni idrolitiche, complesse reazioni di sintesi come l'idrossilazione aromatica, la chimica della protezione enzimatica di gruppi e la degradazione di composti tossici e pericolosi per l'ambiente (Cabral *et al.*, 1994).

Rispetto ai catalizzatori chimici, quelli biologici presentano il vantaggio della regioselettività e stereospecificità che consentono di ottenere un solo prodotto enantiomerico, in linea con i requisiti legislativi richiesti ai fini dell'impiego farmacologico, agricolo ed alimentare. Essi sono inoltre catalizzatori efficaci dal punto di vista energetico poiché in grado di lavorare in condizioni di temperatura, pressione e pH moderati. Lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinato, inoltre, ha portato al miglioramento della produzione di enzimi in differenti organismi ospiti, ampliando enormemente la scelta dell'enzima più adatto a ciascun bioprocesso.

1.5.1 Classificazione dei biocatalizzatori

I biocatalizzatori attualmente noti si distinguono in:

- 1) enzimi liberi;
- 2) enzimi immobilizzati;
- 3) cellule libere;
- 4) cellule immobilizzate.

In termini generali l'enzima può essere impiegato sia nella cellula in cui è contenuto, mantenendolo in tal modo nell'ambiente più adatto alla propria struttura, sia in forma molecolare e cioè privato del suo intorno naturale. In entrambi i casi, comunque, è possibile utilizzare il biocatalizzatore sia in forma libera, ovvero solubile, che immobilizzata, cioè associato in modo reversibile o irreversibile ad un supporto solido.

La scelta del tipo di enzima da utilizzare, pertanto, rappresenta un momento chiave del processo di bioconversione e la messa a punto di un'efficiente tecnica, oltre a bioreattori ottimali, richiede un attento esame dei fattori che influenzano lo sviluppo dei biocatalizzatori e dei mezzi di reazione coinvolti (Lilly, 1992).

1.5.2 Selezione del biocatalizzatore

Dopo aver individuato un appropriato materiale di partenza da convertire, è necessario selezionare l'enzima che presenta l'attività, la selettività e la stabilità più adatte a lavorare nelle condizioni ambientali richieste (Benucci, 2007). Esistono diverse strategie per ottenere il biocatalizzatore più idoneo al processo.

Screening per nuovi biocatalizzatori

Questa tecnica presuppone la disponibilità di metodi di riconoscimento poco costosi, semplici, rapidi e selettivi. Molto utili si sono rivelati i metodi di selezione su piastra come nel caso dell'idrolizzazione della L-tirosina a L-DOPA, un farmaco impiegato per il trattamento della malattia di Parkinson. Le colonie in grado di produrre L-DOPA sono facilmente individuabili aggiungendo ioni di ferro alle piastre di agar, poiché si colorano di violetto.

Questo tipo di selezione, che presuppone la presenza di elevate concentrazioni del composto bersaglio, è stato utilizzato con successo per isolare ceppi capaci di assimilare l'acido benzoico e produrre acido cis-muconico, ma anche per isolare enzimi che idrolizzano nitrile come la nitrile idrasi, la nitrilasi e l'amildasi, che hanno un enorme potenziale come catalizzatori per produrre amidi ed acidi di grande valore a partire dai corrispondenti nitrili.

Uso di biocatalizzatori esistenti

Una via nota da tempo per ottenere la biotrasformazione desiderata, è quella di impiegare gli enzimi esistenti su substrati naturali o artificiali in differenti condizioni di reazione. Le lipasi, ad esempio, sono state spesso utilizzate come catalizzatori di reazioni di esterificazione, interesterificazione e transesterificazione, in mezzi con un'attività acquosa controllata.

Modificazioni genetiche di biocatalizzatori esistenti

Un modo diverso per ottenere un biocatalizzatore, è quello di costruirlo in vivo ed in vitro. L'ingegneria genetica in vivo è stata applicata su larga scala per ottenere un organismo ricombinante dotato dell'attività enzimatica desiderata. Gli eventi che conducono a nuove attività enzimatiche, comprendono il trasferimento genetico, la duplicazione del materiale genetico, la fusione e la ricombinazione fra geni, la delezione o l'inserzione di segmenti genici e una o più mutazioni puntiformi, o una combinazione di queste attività. Un esempio di questa tecnica è rappresentato dalla biosintesi di indaco da *Escherichia coli*: assemblando geni codificanti la formazione del triptofano, il gene della triptofanasi e un frammento del plasmide NAH di uno *Pseudomonas* codificante la naftaline diossigenasi, è stato ottenuto un *Escherichia coli* ricombinante che è in grado di sintetizzare indaco partendo da un composto semplice.

Un altro approccio è quello di utilizzare l'ingegneria proteica per modificare un enzima o una proteina esistente o per creare una proteina nuova con proprietà prespecificate. Questo processo può essere visto come un ciclo interattivo fatto di diverse tappe interconnesse. Lo scopo dell'ingegneria proteica è da sempre stato quello di chiarire le correlazioni struttura-funzione di proteine e l'uso di queste informazioni per sviluppare o modificare enzimi con caratteristiche migliori .

1.5.3 Immobilizzazione dei biocatalizzatori

Per avere bioconversioni efficienti, ripetibili, con ottime rese e tempi di reazione accettabili, i biocatalizzatori devono essere utilizzati nella forma più idonea. Per questo si

ricorre spesso all'impiego di enzimi immobilizzati, ossia associati in modo reversibile o irreversibile ad un supporto solido, caratterizzati da una più elevata stabilità meccanica.

La tecnica dell'immobilizzazione è nota da diversi decenni, ovvero da quando si è riscontrato che alcuni enzimi sono in grado di conservare la propria attività dopo essere stati adsorbiti su supporti solidi naturali quali le argille. Lo sviluppo continuo della cromatografia, inoltre, ha dato un notevole impulso all'introduzione di nuove tecniche di immobilizzazione tanto che oggi gli enzimi immobilizzati rappresentano una realtà consolidata anche nell'ambito industriale.

I principali vantaggi degli enzimi immobilizzati sono:

a) la possibilità di utilizzare l'enzima in più cicli operativi, sia in *batch* che in flusso continuo, recuperando il catalizzatore a fine reazione essendo questo in forma fisica differente da substrati e prodotti di reazione;

b) un maggiore controllo della reazione, in quanto l'enzima può essere separato velocemente dalla soluzione;

c) la capacità di sviluppare diverse tecnologie applicative per reazioni in continuo, sia in colonna che in *batch*;

d) la possibilità di effettuare più reazioni consecutivamente co-immobilizzando due o più enzimi sulla stessa matrice, oppure trasferendo il prodotto di una reazione in un secondo reattore per la trasformazione enzimatica successiva;

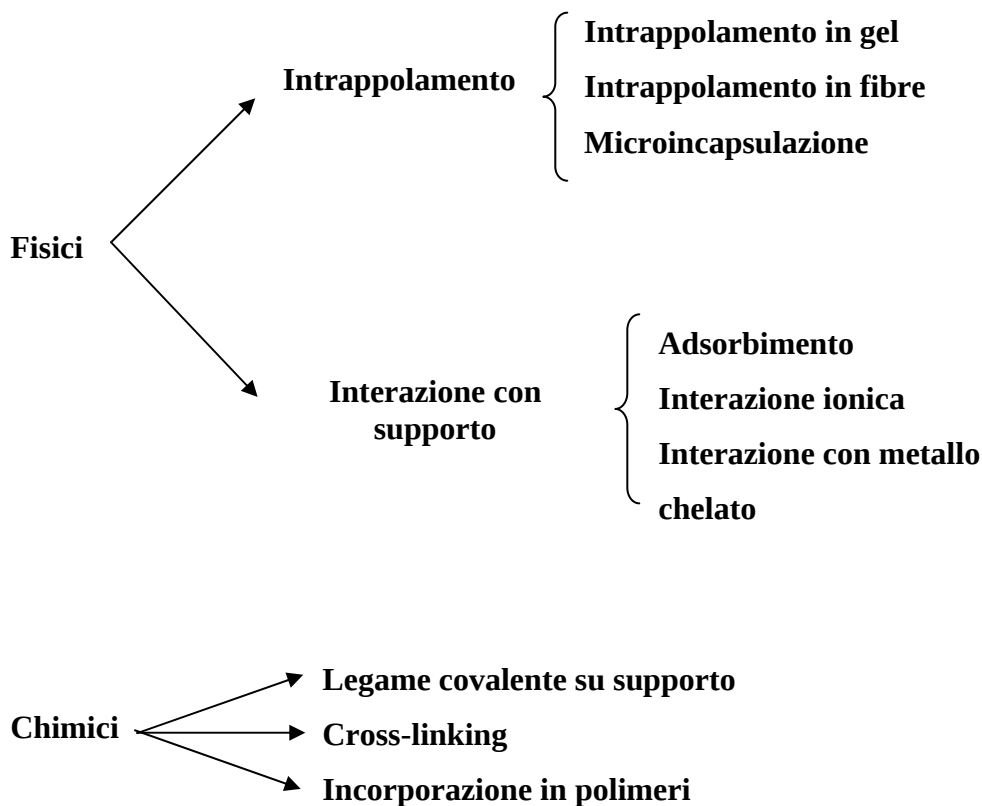
e) la modifica delle proprietà chimico-fisiche degli enzimi, con distorsioni configurazionali e possibili incrementi dell'efficienza catalitica;

f) il frequente aumento della stabilità operativa dell'enzima, specialmente alla temperatura e al numero di cicli di reazione effettuabili.

A questi si aggiungono i vantaggi intrinsecamente legati all'enzima, quali la selettività, le condizioni blande di reazione e il contenuto impatto ambientale.

1.5.4 Tecniche di immobilizzazione dei biocatalizzatori

Le metodologie di immobilizzazione attualmente note possono variare in funzione dei supporti impiegati, dei reattivi usati per l'attivazione o *cross-linking* e sono talmente numerose che risulta estremamente complesso classificarle in modo univoco. Una delle classificazioni più impiegate è quella che distingue le tecniche d'immobilizzazione in metodi fisici e chimici, come di seguito illustrato:



1.5.5 Metodi fisici di immobilizzazione

Possono distorcere la configurazione tridimensionale della proteina enzimatica ma non comportano alcuna modifica dal punto di vista chimico.

Intrappolamento

La tecnica di intrappolamento può essere eseguita in gel, fibre o microcapsule e consiste nell'inglobare l'enzima all'interno della trama tridimensionale di un polimero, che agisce da barriera impedendo la fuoriuscita del biocatalizzatore il quale conserva comunque la propria attività.

Nell'intrappolamento in gel, la forma finale assunta dal polimero è spesso quella di uno strato relativamente sottile, simile ad un foglio. Un esempio tipico è l'inglobamento in poliacrilamide, con procedure praticamente uguali a quelle impiegate per la

preparazione dei gel elettroforetici. Enzimi così immobilizzati hanno applicazioni molto interessanti: lo strato sottile posto sugli elettrodi, permette la preparazione di biosensori specifici come quelli con glucosio ossidasi o ureasi, impiegati sia nel settore ambientale che in quello diagnostico.

La tecnica dell'intrappolamento in fibre, invece, ha trovato ampia applicazione su scala industriale. Enzimi inglobati in fibre di acetato di cellulosa sono comunemente utilizzate in grandi impianti. Alcune acilasi, ad esempio, sono fonte di diverse tonnellate annue di intermedi farmaceutici. Attualmente questo sistema di intrappolamento è comunque superato da quello su resine.

Con la microincapsulazione il biocatalizzatore viene bloccato all'interno di micelle che si formano aggiungendo, sotto agitazione, un polimero disciolto in un solvente organico ad una sospensione enzimatica contenente un detergente in grado di diminuire la tensione superficiale ed agevolare la formazione delle microcapsule.

Interazione con supporto solido

Grazie alla sua semplicità, è stato il primo sistema di immobilizzazione ad essere sperimentato e si caratterizza, oltre che per il basso costo della procedura, per la capacità di preservare sia la conformazione nativa dell'enzima immobilizzato, che la sua attività catalitica intrinseca.

Le interazioni tra biocatalizzatore e supporto, comportano la formazione di legami deboli quali attrazioni di tipo polare, ionico, forze di Van der Waals, e si differenziano per il tipo di legame che si genera tra supporto ed enzima.

La tecnica dell'adsorbimento, ad esempio, si basa su interazioni di bassa e media intensità con supporti facilmente reperibili quali quarzo, carboni, vetro poroso ed argille. Altri materiali inorganici utilizzati da tempo sono la silice e le terre diatomacee delle quali fa parte il tipo denominato *Celite*, un supporto costituito per lo più da silice, con presenza di ossidi di alluminio, ferro e calcio.

A questi materiali inorganici si aggiungono poi quelli organici naturali o sintetici: matrici su base stirenica o acrilica hanno dato in diverse applicazioni buoni risultati, anche grazie al vantaggio di poter modulare vari parametri in fase di sintesi del polimero. L'applicazione di questo metodo è tuttavia severamente limitata dalla natura reversibile del legame che si forma tra biocatalizzatore e supporto, in virtù della sua stretta

dipendenza dalle condizioni del processo come la temperatura, il pH, la forza ionica e la costante dielettrica.

Le interazioni ioniche, invece, si basano sull'attrazione tra gruppi aventi carica opposta. La scelta dei supporti può spaziare tra vari tipi di matrice con gruppi funzionali ionizzabili e, naturalmente, in funzione della carica netta dell'enzima o delle cellule. L'interazione ionica dà al legame una maggiore intensità rispetto al semplice adsorbimento ma il legame è pur sempre di tipo reversibile. Ciò consente il riutilizzo della matrice a patto che questa abbia mantenuto la sua integrità e sia possibile ripristinare la sua originaria capacità di scambio.

1.5.6 Metodi chimici di immobilizzazione

L'approccio più studiato per l'immobilizzazione degli enzimi, è quello che comporta la formazione di legami covalenti tra i residui amminoacidici della proteina ed i gruppi reattivi del supporto. In linea di principio la grande varietà di reazioni di attivazione di superficie e accoppiamento possibili, lo rende un metodo applicabile in modo generale. Tuttavia l'alto costo dei materiali, le procedure spesso complicate e la quasi inevitabile perdita dell'attività catalitica, restringono le applicazioni pratiche di questi sistemi di immobilizzazione a casi che presentano specifici vantaggi.

Cross-linking

Questa tecnica prevede la formazione di un legame covalente tra le varie molecole dell'enzima, o tra una cellula e l'altra, in modo da formare una rete tridimensionale con ponti trasversali che stabilizzano la struttura.

La soluzione è in genere trattata con agenti chimici biofunzionali come la glutaraldeide che lega covalentemente i residui amminici di due diverse molecole, determinando una struttura finale immobilizzata ma con ridotta stabilità meccanica. La glutaraldeide è da sempre il composto più usato per la formazione di legami crociati e reagisce con i residui di lisina dell'enzima formando una base di Schiff. Il legame che si crea tra enzima e glutaraldeide è irreversibile e capace di sopportare valori estremi di pH e temperatura: ciò suggerisce che il ponte aldimina sia stabilizzato. La formazione di legami crociati del biocatalizzatore con la glutaraldeide, dipende in modo critico dal

delicato bilancio di fattori come la concentrazione del biocatalizzatore e del reagente, il pH e la forza ionica delle soluzioni acquose, la temperatura ed il tempo di reazione. Questo metodo è stato impiegato con successo per immobilizzare biocatalizzatori industriali come la glucosio isomerasi e la penicillina amidasi.

Oltre alla glutaraldeide si possono utilizzare altri agenti bifunzionali quali isocianati, diazobenzidine e suberimidati, più diffusi in laboratorio o su scale applicative contenute.

Il *cross-linking* può essere utilizzato anche per stabilizzare immobilizzati ottenuti con altre metodiche come i gel di alginato o per creare interazioni su supporti solidi.

Incorporazione in polimeri

Questa tecnica può essere definita un *cross-linking* eterogeneo poiché l'enzima, miscelato con monomeri sintetici, origina un copolimero nella trama tridimensionale del quale si alternano monomeri e molecole del biocatalizzatore.

L'uso di monomeri acrilici o ammidici permette di ottenere polimeri meccanicamente più stabili di quelli generati per *cross-linking* e con una maggiore concentrazione dell'enzima.

1.5.7 Immobilizzazione covalente su supporto solido

La preparazione di forme immobilizzate che coinvolgono legami covalenti tra il supporto solido e l'enzima, rappresenta una delle tecniche più interessanti e sempre più in uso, grazie alla stabilità del legame ed alla flessibilità operativa. I gruppi funzionali coinvolti nella formazione del legame covalente fra enzima e supporto possono essere molteplici come mostrato in figura 16.

L'affermazione di questa tecnica di immobilizzazione si deve soprattutto allo sviluppo della cromatografia di affinità, rispetto alla quale presenta problematiche simili. Ottenere un valido biocatalizzatore solido, comporta infatti passaggi critici che vanno dall'individuazione di matrici caratterizzate da un'adeguata porosità, idrofilicità e numero di gruppi reattivi, alla scelta di adeguati bracci spaziatori ed agenti attivanti, per permettere il legame covalente sul supporto.

Rispetto alla cromatografia di affinità, questo sistema si differenzia per il fatto che il ligando non è più una molecola in grado di interagire reversibilmente con enzimi, anticorpi o altro, ma è l'enzima stesso o la cellula.

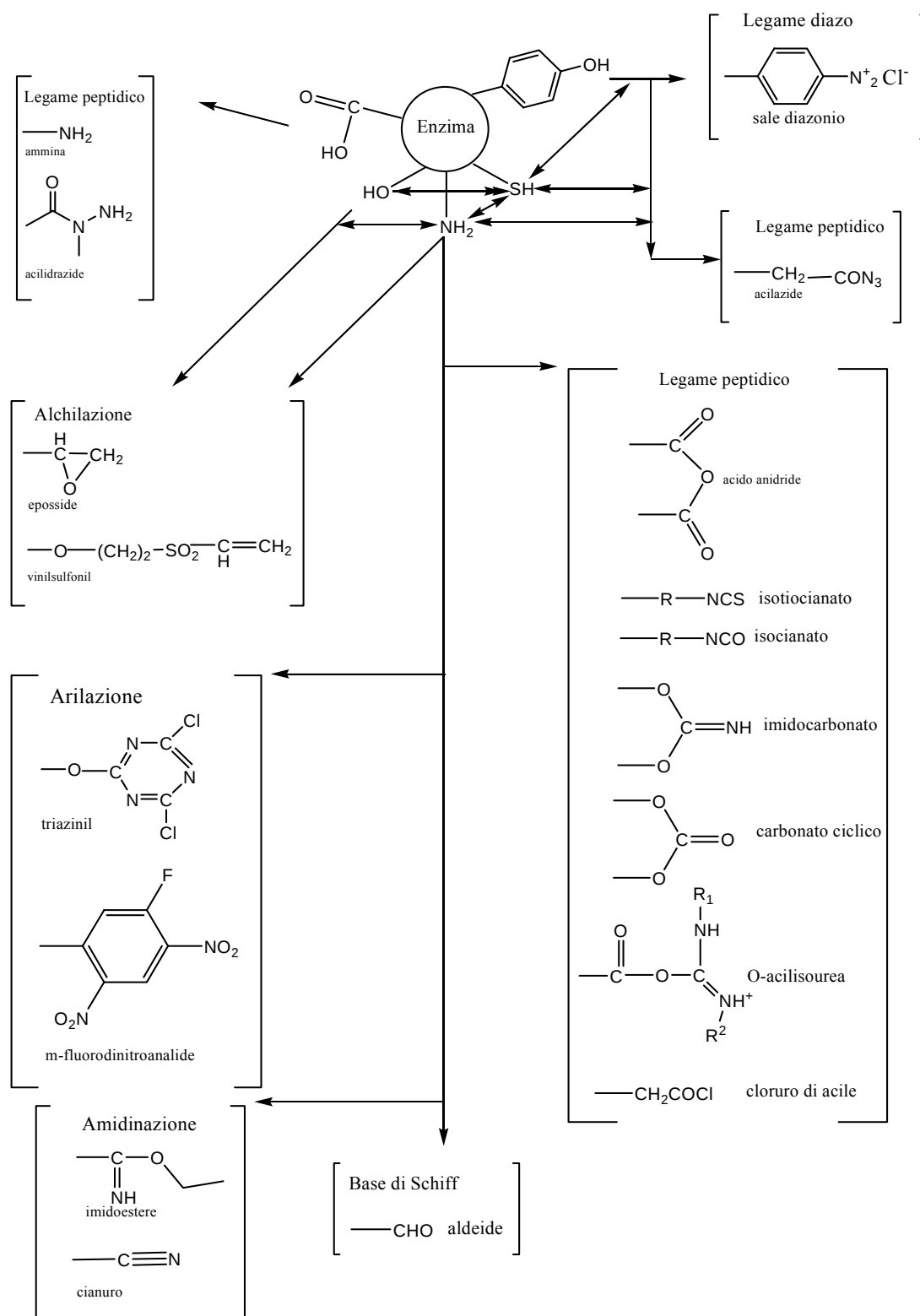


Figura 16: schema di legame covalente di enzimi con gruppi attivi su supporto.

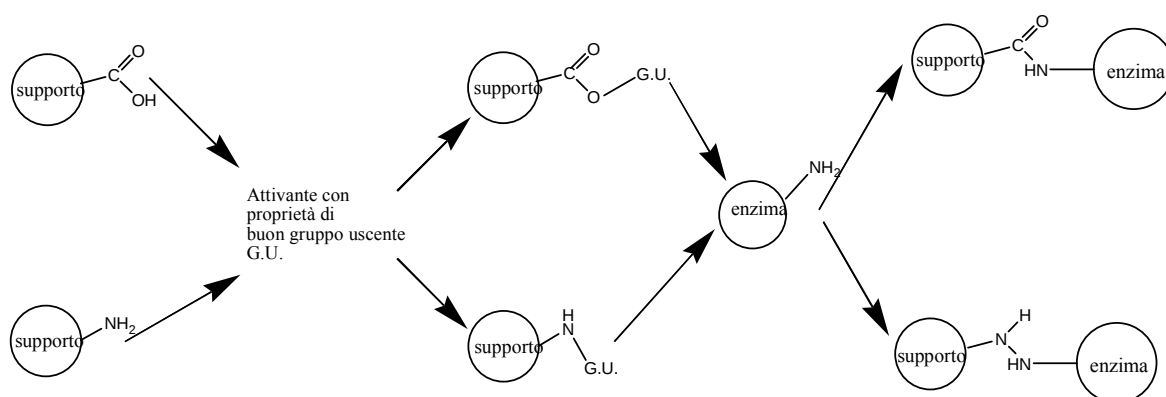
1.5.8 Gruppi chimici coinvolti nel legame

Proteine e cellule, per poter essere fissate covalentemente, devono avere dei gruppi chimici adatti, gli stessi coinvolti durante le reazioni di *cross-linking* e incorporazione in polimeri. Nel caso degli enzimi, gli amminoacidi che li compongono contengono diversi gruppi suscettibili alla formazione di legami covalenti con la matrice. Alcuni tra i più importanti sono:

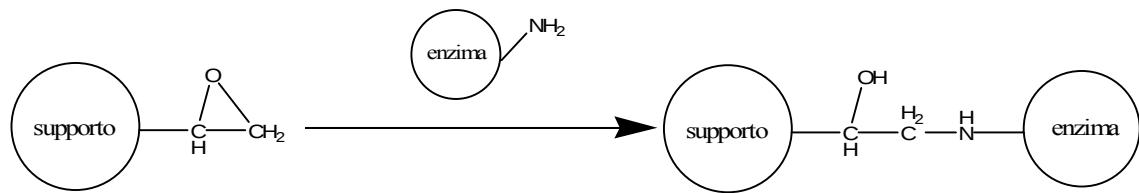
- i gruppi amminici, principalmente quello in posizione ϵ della lisina, il residuo amminico N-terminale della catena proteica ed in misura minore anche il gruppo guanidinico dell'arginina, l'imidazolo dell'istidina e l'indolo del triptofano;
- i gruppi carbossilici forniti dal carbonio terminale della proteina e dagli amminoacidi che ne possiedono una catena laterale, come gli acidi aspartico e glutammico;
- i gruppi sulfidrici dei residui di cisteina che formano ponti disolfuro tra le cisteine adiacenti della struttura terziaria delle proteine;
- i gruppi tiolici, fenolici e idrossilici come la serina ed il gruppo $-OH$ di treonina e tiroxina, che presentano comunque una reattività ridotta.

I principali meccanismi chimici attraverso i quali l'enzima si lega al supporto sono di seguito descritti:

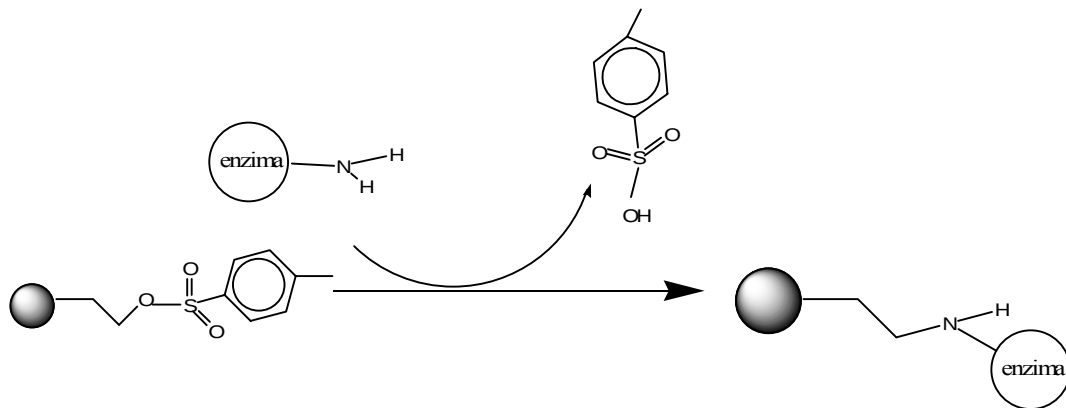
gruppi carbossilici ed amminici attivati



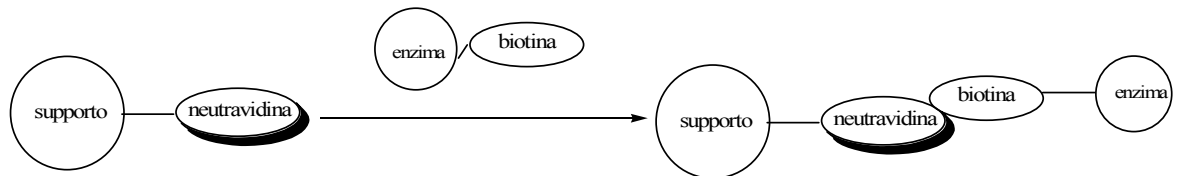
gruppi epossidici



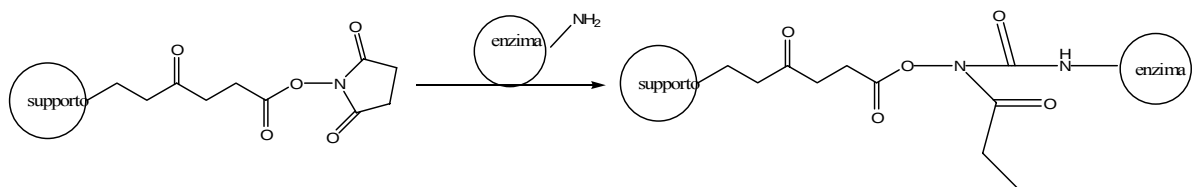
siti tosilattivi



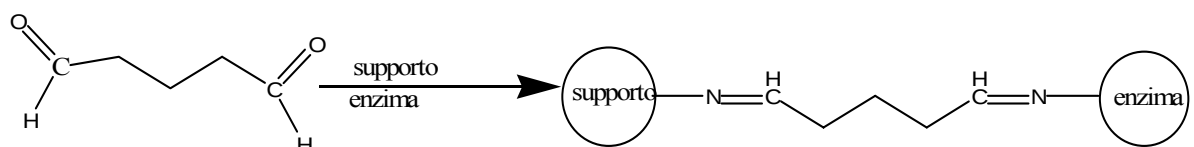
neutravidina



anidridi



glutaraldeide



1.5.9 Supporti per l'immobilizzazione

Lo sviluppo di un biocatalizzatore utile e immobilizzato su un supporto, comporta necessariamente la scelta di matrici solide. Idealmente questa tappa di selezione dovrebbe essere basata su dati strutturali e di attività certi per il biocatalizzatore ed il metodo generale di immobilizzazione da usare, oltre che per le condizioni del processo. I fattori più importanti da considerare per scegliere il supporto più adeguato tra la vasta gamma a disposizione sono riportati in tabella 3 e 4.

La caratteristica essenziale che il supporto deve avere, è rappresentata dalla disponibilità di gruppi chimici che, direttamente o dopo essere stati modificati, siano in grado di formare il legame covalente con i residui reattivi delle proteine. Integrare l'immobilizzazione di un biocatalizzatore in un processo, comunque, implica che siano considerati molti fattori anche se nella pratica la soluzione ottimale risulta essere spesso l'uso di supporti più flessibili. Un supporto poroso, ad esempio, ha il vantaggio di poter immobilizzare grossi carichi di biocatalizzatore tuttavia, per evitare le limitazioni della diffusione, questo stesso supporto dovrebbe essere più convenientemente usato sotto forma di particelle molto piccole. In altri casi la scelta del supporto dipende da un singolo o da pochi fattori. Questo è il caso di sistemi nei quali lo scopo principale è quello di preservare l'attività del biocatalizzatore in presenza di componenti aggressive nel mezzo di reazione come specie tossiche, solventi organici o forti inibitori. In questi casi una matrice porosa, che intrappola il biocatalizzatore ed esclude l'inibitore, è spesso la sola scelta efficace, senza considerare gli ostacoli diffusionali che possono rallentare la reazione. La possibilità di cambiare la forma, la porosità o l'idrofobicità del supporto, può rappresentare un vantaggio nel senso che permette di ottenere un'adeguata modulazione dell'esclusione per dimensioni del substrato o del non substrato e delle velocità di trasferimento di massa esterne ed interne.

La scelta del supporto comporta in via generale l'analisi di diversi parametri. Attualmente sono disponibili molte tipologie di matrici: dai polisaccaridi alle resine polistireniche, fino alle formofenoliche e acriliche. L'affermarsi in maniera sempre più ampia dell'immobilizzazione covalente e della cromatografia di affinità, tecniche con fini diversi ma con approccio simile, ha permesso di mettere a punto e commercializzare resine pronte all'uso, ovvero con un gruppo reattivo in grado di legare immediatamente l'enzima o la cellula senza passaggi intermedi.

I gruppi funzionali più importanti delle resine pronte all'uso sono:

- epossidico;
- formile;
- N-idrossisuccinimide.

Tabella 3: aspetti importanti nella natura chimica dei supporti potenziali per l'immobilizzazione dei biocatalizzatori.

	Natura chimica/origine			
	Organico		Inorganico	
	Naturale	Sintetico	Minerale	Fabbricato
<i>Disponibilità di gruppi funzionali reattivi</i>				
Usabile con una grande varietà di biocatalizzatori	++	+++	+	+
Ampia gamma di tecniche per l'attivazione di superficie	++	+++	+	+
Commercialmente disponibili supporti pre-attivati	+++	++	-	+
Usabile con le tecniche di formazione del lattice	+++	+++	-	-
<i>Possibilità di aggiustare il carattere idrofilico/idrofobico</i>				
Sensibilità ad agenti fisici, chimici e microbici	+	+++	+	+
Sensibilità a cambiamenti nella composizione dei mezzi di reazione	+	++	+++	+++
Resistenza ad alte temperature	-	+	+++	+++
Resistenza a grandi pressioni idrostatiche o idrodinamiche	-	++	+++	+++
Rigenerabilità	-	+	+++	++
Basso costo/disponibilità	+++	+	+++	+
<i>Morfologia del supporto ottenibile</i>				
Usabile una gamma di diametri o spessori	++	+++	+	+++
Disponibile una gamma di porosità	+	++	++	++
Forme ottenibili	+	++	++	++
Sfere	++	++	-	+++
Fibre	++	+++	-	+++
Fogli/membrane	++	+++	-	+++
<i>Note: - inadeguato; + scarso; ++ discreto; +++ buono.</i>				

Tabella 4: aspetti importanti della morfologia dei supporti potenziali per l'immobilizzazione dei biocatalizzatori.

Caratteristiche	Morfologia				
	Porosi		Non porosi		
	Area totale della superficie disponibile per unità di peso		+++	+	
	Bassa incidenza di limitazioni diffusionali		+	+++	
	Carico di biocatalizzatore ottenibile		+++	+	
	Protezione del biocatalizzatore da aggressioni esterne		++	+	
	Usabile con substrati macromolecolari		+	+++	
	Fabbricati				
	Minerale	Inorganico	Gel		
	Uniformità delle dimensioni dei pori	+	+++	++	Inapplicabile
	Stabilità delle dimensioni dei pori	++	+++	+	Inapplicabile
Basso costo	+++	-	++	+++	
Note: - inadeguato; + scarso; ++ discreto; +++ buono.					

Tabella 5: supporti più comunemente impiegati per l'immobilizzazione enzimatica.

Componenti	Supporti non magnetici	Supporti magnetici
Materiali	Agarosio, chitina/chitosano, cellulosa, esopolisaccaridi, silice, Eupergit C, cheratina, bentonite, acido acrilico ^b , metilmetacrilato ^b , etilen glicol dimetacrilato ^b , 2-idrossietil metacrilato ^b , butil acrilato ^b , acrilonitrile ^b , acrilamide ^b , N-isopropilacrilamide ^b , vinil alcool ^a , alchil poliamine ^b , acido lattico ^b , acido glicolico ^b , acido malico ^b , stirene ^{a,b} , uretano ^a	Agarosio, chitina/chitosano, cellulosa, esopolisaccaridi, silice, acido acrilico ^b , glicidilmetacrilato ^b , metilmetacrilato ^b , acrilamide ^b , etilene glicol ^b , acido lattico ^b , acido glicolico ^b , acido sulfonico ^b , stirene ^{a,b} , uretano ^a
Gruppi funzionali	-C(O)OH, -NH ₂ , -OH, -SH, -C(O)H, anidride, forme attivate (tosylattivate, epossiativate)	-C(O)OH, -NH ₂ , -OH, forme attivate (tosylattivate, epossiativate)
Cross-linker	Transglutaminasi, glutaraldeide, etilenedimetilmetacrilato, polietilen glicol	Glutaraldeide, succinil cloride
Stabilizzanti	Polimeri con alto peso molecolare	Polimeri con alto peso molecolare

^a Monomeri usati in forma polimerica; ^b Monomeri usati in forma copolimerica.

Tutti questi gruppi sono disponibili su matrici di diversa natura e commercialmente sono diffusissimi: Eupergit (Röhm GmbH), Sepabeads FP-EP (Resindion s.r.l.), Epoxy Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech), aventi gruppi ossirani presenti in polimeri di

acrilamide, metacrilati e destrano. Eupergit e Sepabeads sono inoltre disponibili per applicazioni industriali su grande scala.

La capacità di scambio e di assorbimento delle matrici, dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del supporto stesso. Granulometria e porosità, possono infatti condizionare la capacità di legare più molecole enzimatiche e incidere sulla possibilità di utilizzare anche l'interno dei pori della matrice se con dimensioni sufficienti.

Il mercato ha risposto a questa richiesta con matrici a granulometria differente e porosità variabili da 50-100 μm fino a 2000 e più μm di diametro, arrivando fino alle matrici macroporose.

In tabella 5 sono riportati i supporti più comunemente impiegati, suddivisi in magnetici e non magnetici.

Naturalmente la matrice deve anche essere adeguatamente idrofila per evitare che la superficie del supporto, se troppo idrofoba, determini una repulsione nei confronti dell'enzima rendendo più difficile il legame.

1.5.10 Attivazione dei gruppi funzionali e immobilizzazione

Affinché si formi il legame covalente tra la matrice solida e l'enzima, è necessario che le due parti abbiano gruppi funzionali sufficientemente reattivi. A volte questa condizione può non realizzarsi ad esempio, in condizioni operative blande, usando una resina con gruppi carbossilici, nessun amminoacido di una proteina potrà reagire covalentemente con una matrice. Ancora più difficoltoso potrà risultare l'uso dell'ammina primaria di un supporto al fine di legare covalentemente i residui amminici lisinici di un enzima.

Questi inconvenienti operativi si possono superare attraverso l'attivazione dei gruppi funzionali della resina, che vengono fatti reagire con composti chimici in grado di modificarli in forma tale da renderli più reattivi ed in grado di formare i legami desiderati.

1.5.11 Modificazioni del supporto dopo l'immobilizzazione

Al termine dell'immobilizzazione, alcuni gruppi attivi della matrice potrebbero non aver reagito e, se in grado di resistere alle condizioni operative, potrebbero legarsi alle molecole di prodotto durante la bioconversione. Se si riscontrano sperimentalmente questi

inconvenienti, si può procedere al cosiddetto *blocking excess groups* impiegando piccole molecole capaci di legarsi covalentemente ai gruppi residui in modo da saturarli. Scegliendo opportunamente queste molecole, è possibile modificare almeno parzialmente le caratteristiche del microambiente superficiale del supporto, rendendolo ad esempio più idrofilo con tioglicerolo o più idrofobo con benzil mercaptano.

Anche la carica totale può essere variata, ad esempio bloccando i gruppi residui con molecole ionizzate positivamente o negativamente. Nel caso in cui fosse necessario un passaggio aggiuntivo fra quelli elencati, occorrerebbe verificare che gli agenti chimici utilizzati non abbiano arrecato danno all'attività del biocatalizzatore immobilizzato.

1.5.12 Vantaggi e svantaggi dell'immobilizzazione

Le tabelle 6 e 7 di seguito riportate riassumono i principali vantaggi e le limitazioni connesse all'impiego di enzimi immobilizzati.

Tabella 6: vantaggi relativi all'impiego di enzimi immobilizzati.

Aspetti generali	Aspetti specifici
Ritenzione del biocatalizzatore nel bioreattore	-Possibile riutilizzo del biocatalizzatore
	-Assenza di contaminazione del prodotto
	-Alte velocità di diluizione senza rimozione del biocatalizzatore
Alta concentrazione del biocatalizzatore	-Aumentata produttività volumetrica
	-Rapida conversione di substrati instabili
	-Minimizzazione delle reazioni collaterali
Controllo del microambiente del biocatalizzatore	-Manipolazione dell'attività e della specificità del biocatalizzatore
	-Stabilizzazione dell'attività del biocatalizzatore
	-Protezione di biocatalizzatori sensibili a forze di taglio
Facilitata separazione del biocatalizzatore dal prodotto	-Controllo preciso del tempo di bioreazione
	-Minimizzazione di ulteriore trasformazione del prodotto

Tabella 7: limitazioni connesse all'impiego di enzimi immobilizzati.

Aspetti generali	Aspetti specifici
Maggiori costi di produzione	-Maggiore richiesta di materiale e strumentazione -Richiesta di specifiche configurazioni del reattore
Perdita di attività durante l'immobilizzazione	-Esposizione a pH e temperature estreme -Esposizione a reagenti tossici -Esposizione ad alte forze di taglio o tensioni meccaniche -Esclusione di substrati macromolecolari -Blocco del sito attivo -Modificazioni locali di pH -Limitazioni di trasferimento di massa
Perdita di attività durante le operazioni nel bioreattore	-Erosione o solubilizzazione della matrice -Particelle di supporto trascinate dal flusso -Sviluppo di inibitori nel microambiente -Ritenzione di solidi sospesi -Crescita di specie contaminanti
Empirismo	-Richiesta di ottimizzazione multiparametrica per casi specifici -Difficoltà di modellamento e controllo del processo

I biocatalizzatori immobilizzati covalentemente rappresentano una realtà industriale con potenzialità sempre nuove. I vantaggi del loro utilizzo coincidono con quelli elencati per i biocatalizzatori immobilizzati in genere, a cui si aggiungono ulteriori aspetti positivi:

- la stabilità del legame con la matrice fa sì che non ci sia praticamente rilascio nel tempo, condizione questa estremamente vantaggiosa nelle bioconversioni in quanto garantisce l'assenza di materiale proteico non desiderato nei prodotti di reazione;
- le molecole enzimatiche sono fissate in maniera piuttosto rigida dai legami, soprattutto se i gruppi attivi legano la proteina in più punti: così facendo l'enzima risulta più stabile ai processi di denaturazione ed alle variazioni di pH, temperatura come anche all'attacco di muffe e microrganismi;
- l'immobilizzazione può essere eseguita con diverse tecniche operative, sia in *batch* che in colonna.

Il principale aspetto negativo comune anche ad altri tipi di immobilizzazione, è la formazione di legami poco specifici. E' infatti possibile selezionare una particolare categoria di residui dell'enzima, ad esempio $-NH_2$ piuttosto che $-COOH$, ma non si è in grado di legare solo un amminoacido piuttosto che un altro, evitare di bloccare gli N o C terminali, o di coinvolgere amminoacidi molto importanti per la corretta funzionalità del sito attivo. Questa mancanza di selettività può, in alcuni casi, dare origine ad enzimi immobilizzati con attività ridotta rispetto alle aspettative o addirittura denaturati anche per effetto della rigidità dei legami e della forte interazione della matrice.

1.5.13 Aspetti normativi dell'uso degli enzimi immobilizzati

Attualmente la maggior parte degli enzimi impiegati nel settore alimentare si presentano in forma libera ossia in formulazioni liquide (soluzioni) o granulari che devono essere appositamente preparate prima dell'uso. La necessità di utilizzare biocatalizzatori immobilizzati nasce sia da motivi puramente tecnici, che per esigenze burocratiche. In questi ultimi anni, infatti, la Comunità Europea ha posto particolare attenzione alla salvaguardia della salute del cittadino-consumatore, adottando una serie di normative applicate al settore alimentare che disciplinano in particolare la presenza di allergeni e l'impiego di enzimi per la produzione degli alimenti.

Le preoccupazioni del legislatore nascono dal fatto che gli enzimi impiegati nel settore alimentare, trovandosi in forma libera, possono ritrovarsi nel prodotto finito causando fenomeni di allergenicità. Attualmente è al vaglio della Commissione Europea una proposta di modifica (n° 0144/2006) della direttiva quadro 89/107/CEE relativa all'utilizzo di additivi nel settore alimentare.

OD	densità ottica;
OD _{360nm}	densità ottica a 360 nm;
OD _{600nm}	densità ottica a 600 nm;
U	unità enzimatiche corrispondenti a un decremento di OD di 0.001 min ⁻¹ ((Δ OD min ⁻¹ - Δ OD min ⁻¹ bianco)10 ³);
V _{max app}	attività massima iniziale apparente (U mg ⁻¹ HEWL libero);
K _{m app}	concentrazione di substrato apparente in cui l'attività iniziale è la metà del suo massimo valore (mL di substrato);
K _{cat app}	numero di turnover apparente, il numero di molecole di substrato convertite da ogni sito attivo dell'enzima in prodotto per unità di tempo e in cui l'enzima lavora al massimo dell'efficienza (s ⁻¹);
K _{a app}	costante di specificità apparente (s ⁻¹ mL ⁻¹);
FSA	attività specifica di HEWL libero (U mg ⁻¹ HEWL libero);
FSA _{max app}	attività specifica massima apparente di HEWL libero;
ISA	attività specifica di HEWL immobilizzato (U mg ⁻¹ HEWL immobilizzato);
RA%	attività specifica relativa di HEWL immobilizzato comparato a HEWL libero ((ISA FSA ⁻¹)100);
Attività mantenuta %	attività specifica di HEWL immobilizzato dopo un certo numero di cicli di lavoro comparato al primo.

2.0 Scopo del lavoro

La sperimentazione oggetto di questa tesi di dottorato, ha avuto come obiettivo principale lo studio dell'attività catalitica del lisozima (estratto da albume d'uovo di gallina, EC 3.2.1.17)), immobilizzato e in forma libera, in soluzioni di vino modello arricchito con un microrganismo bersaglio (*Oenococcus oeni*). Al fine di valutare l'effetto che la porosità del carrier può avere sulle funzioni catalitiche dell'enzima immobilizzato, il lisozima è stato legato covalentemente su sfere magnetiche non porose e su polimeri acrilici macroporosi.

In particolare, gli obiettivi della presente ricerca sono stati:

- valutare l'applicabilità del microrganismo bersaglio, *Oenococcus oen*, come substrato di reazione per la misura spettrofotometrica dell'attività del lisozima estratto da albume d'uovo di gallina (HEWL);
- selezionare i supporti per l'immobilizzazione di HEWL aventi caratteristiche chimico-fisiche idonee;
- studio della variazione dell'attività di HEWL libero ed immobilizzato in funzione della temperatura e del numero di cicli di lavoro, in soluzioni di vino modello.

3.0 Materiali e Metodi

3.1 Materiali

HEWL è stato gentilmente fornito dalla ditta Fordras SA, Lugano, Svizzera. La purezza del preparato commerciale è stata determinata mediante misura spettrofotometrica a 280 nm ($\epsilon_{280} = 2.56 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, MW 14000 Da).

Le cellule liofilizzate di *Oenococcus oeni* (lotto 50725017059 e R1105) sono state ottenute da fonti commerciali (Lallemand Inc., Italia), si tratta di un preparato ad usi enologici.

I supporti utilizzati per l'immobilizzazione covalente di HEWL sono stati:

- ✓ sfere tosil-attivate magnetiche, non porose, di polistirene, (TAB), (Dynabeads[®] M-280, Invitrogen/Dynal[®], Carlsbad, CA, USA), diametro delle sfere: 2.8 μm , gruppi tosilici come gruppi funzionali di superficie, densità gruppi funzionali 50-70 $\mu\text{mol g}^{-1}$;
- ✓ sfere carbossi-attivate magnetiche, non porose, (CB), (ProMag[™] 3 Series, COOH Surfactant-free, Polysciences Europe GmbH, Eppleheim, Germania), diametro delle sfere: 3 μm , -COOH come gruppo funzionale di superficie, densità gruppi funzionali 365 $\mu\text{eq g}^{-1}$;
- ✓ sfere epossidate macroporose di polimeri acrilici Immobead[™], (IB), (ChiralVision BV., AL Leiden, Paesi Bassi), diametro delle sfere: 150-300 μm .

L' 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide idrocloruro (EDC), il reagente di Bradford, il polietilene glicole (PEG 1000, 3350, 8000, 20000; peso molecolare 1000, 3350, 8000, 20000, rispettivamente) ed il 4-nitrofenilcloroformiato (NPCF) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Gallarate, Italia). Tutti gli altri reagenti utilizzati erano di grado analitico noto e certificato.

3.2 Metodi

3.2.1 Procedura sperimentale

In questa tesi di dottorato di ricerca sono presentati i risultati dell'immobilizzazione covalente di HEWL usando materiali *food-grade* per future applicazioni in vino.

Le attività di ricerca sono state:

- investigare le proprietà cinetiche di HEWL libero a pH acido usando cellule di *Oenococcus oeni* come substrato di reazione;
- comparare l'attività a diversi valori di pH, come 4.5 (optimum), 3.5 e 3.2;
- determinare l'attività antimicrobica, a pH 3.2, per HEWL immobilizzato su diversi supporti;
- valutare la stabilità operativa dei biocatalizzatori immobilizzati.

3.2.2 Immobilizzazione di HEWL su sfere tosil-attivate (TAB)

L'immobilizzazione di HEWL su TAB è stata condotta in base al metodo di Nilsson e Mosbach (1980) e non ha richiesto derivati attivi (Fig. 17). Aliquote (0.25 mL) della sospensione di sfere (30 mg mL^{-1}) sono state lavate tre volte con 0.25 mL di tampone borato (0.1 M, pH 9.5) in eppendorf da 2 mL al fine di rimuovere i preservanti presenti e separate dal surnatante applicando un campo magnetico con un concentratore magnetico (DynaL MPC®-S).

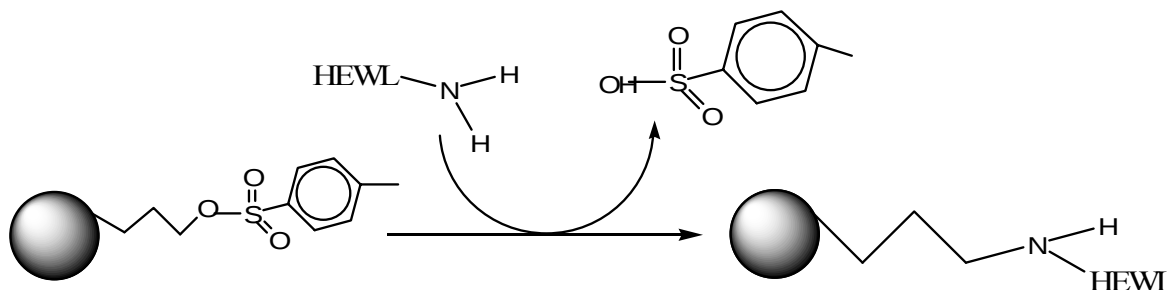


Figura 17: reazione attivata durante l'immobilizzazione di HEWL su TAB mediante legame covalente.

La soluzione di HEWL è stata quindi aggiunta alla sospensione delle sfere ($20 \mu\text{g HEWL mg}^{-1}$ sfere) ed incubata a 37°C per 20 ore con agitatore rotante a capovolgimento.

Dopo aver rimosso il surnatante contenente HEWL libero, le sfere sono state lavate con 0.25 mL di tampone Tris (0.2 M, pH 8.5) per rimuovere gli eventuali gruppi tosilici che non hanno reagito. Infine, le sfere sono state lavate tre volte, conservate in 250 mL di tampone fosfato salino (PBS, 0.01 M, pH 7.4) a 4° C e periodicamente analizzate per l'attività catalitica.

3.2.3 Immobilizzazione di HEWL su sfere carbossi-attivate (CB)

L'immobilizzazione di HEWL su CB è stata condotta sulla base del metodo della carbodiimide usando il reagente condensante EDC per formare legami amidici stabili tra enzima e supporto (Fig. 18). EDC reagisce con i gruppi carbossilici per formare derivato attivo ed instabile, o-acilurea, che successivamente può reagire con gruppi amminici di HEWL dando origine all'enzima immobilizzato (Chen e Chen, 1997). La procedura è stata condotta con 0.25 mL della sospensione di sfere CB (25 mg mL⁻¹) lavata tre volte con tampone carbonato (0.1 M, pH 9.6). Per l'immobilizzazione di HEWL, 50 µL di acqua bidistillata al 2% in EDC è stata aggiunta alle sfere in tampone MES (0.1 M, pH 5.8). Dopo agitazione per 4 ore a 25 °C, le particelle magnetiche sono state recuperate applicando un campo magnetico e quindi poste a reagire con soluzione di HEWL (20 µg HEWL mg⁻¹ sfere) in tampone borato (0.2 M, pH 8.5), incubate a 25 °C per 20 ore con agitatore a ruota. Infine, le sfere sono state trattate, come descritto per TAB.

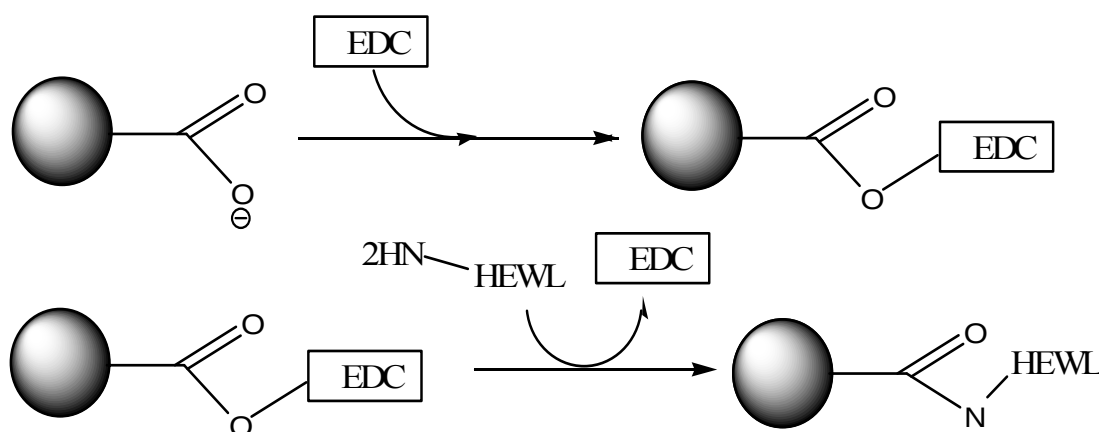


Figura 18: reazione attivata durante l'immobilizzazione di HEWL su TAB mediante legame covalente.

3.2.4 Immobilizzazione di HEWL su sfere epossidattivate (IB)

Le reazioni di formazione di legame tra IB e HEWL sono state condotte senza (Fig. 19a) e con (Fig. 19b) polietilenglicole (PEG 1000, 3350, 8000, 20000) (Zacchigna *et al.*, 1999). Al fine di legare IB a PEG, 0.1 g di IB sono stati miscelati mediante agitatore rotante a capovolgimento per 20 ore a 25° C con 1.7 mL di una soluzione di PEG (peso molecolare 1000, 3350, 8000, 20000), (0.25 g mL⁻¹), a pH 12.

Le sfere legate al PEG (IB-PEG) sono state separate dal surnatante mediante centrifugazione, lavate con acqua e quindi poste a reagire per 20 ore a 25° C con 1.7 mL di una soluzione di glicina (0.1 M, pH 7) in tampone fosfato al fine di saturare i gruppi epossidici che non hanno reagito con PEG.

Le IB-PEG sono lavate con acqua e miscelate goccia a goccia con 2 mL di una soluzione di 4-nitrofenilcloroformiato (NPCF, 0.1M) in cloruro di metilene anidro. Dopo agitazione per 20 ore a 25° C, le sfere sono lavate con tampone borato (0.2 M, pH 8.5) e poste in incubazione per 20 ore a 25° C con 200 µL di HEWL (50 mg mL⁻¹) e 1300 µL di tampone borato. Infine, le sfere sono state conservate come descritto precedentemente.

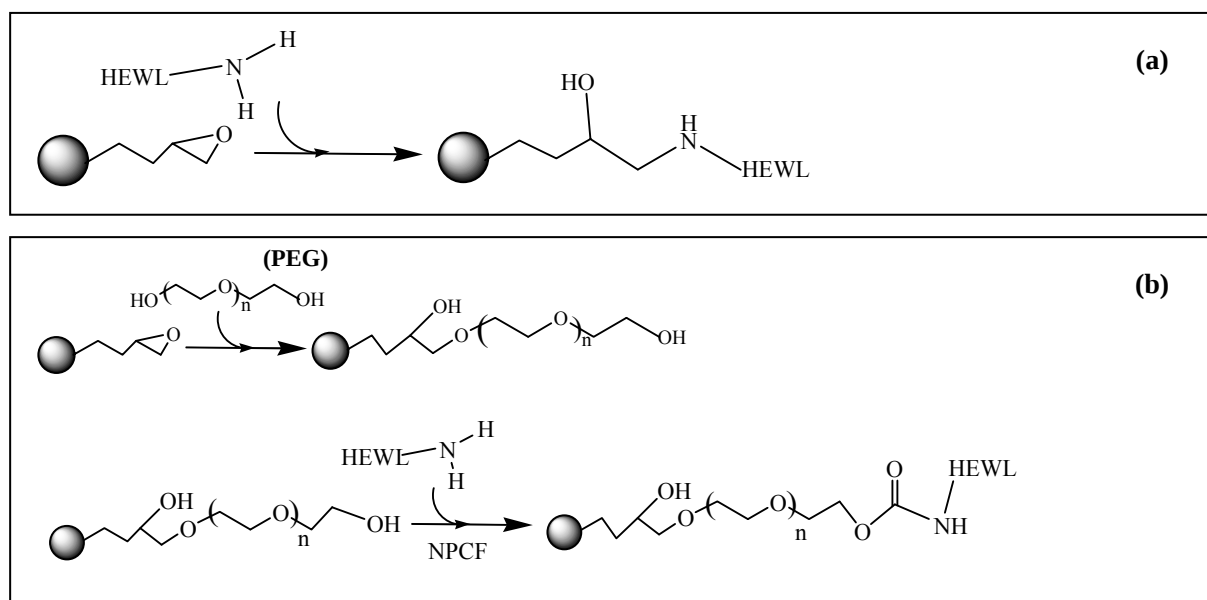


Figura 19: Immobilizzazione di HEWL su IB (a) e IB-PEG (b).

3.2.5 Determinazione della concentrazione di HEWL nella forma libera ed immobilizzata

L'ammontare di HEWL non legato, rimosso lavando le sfere attivate, è stato calcolato con il metodo di Bradford usando HEWL come standard (Bradford, 1976). HEWL legato alle sfere ($\mu\text{g mg}^{-1}$ di resina secca) è stato calcolato mediante bilancio di materia.

3.2.6 Determinazione dell'attività di HEWL

L'attività della forma libera ed immobilizzata di HEWL è stata determinata misurando il decremento della densità ottica di una sospensione cellulare di *Oenococcus oeni* sulla base della metodologia spettrofotometrica sviluppata da Pitotti *et al.* (1991) e descritta come segue.

3.2.6.1 Preparazione del substrato

Al fine di eliminare materiale interferente, le cellule liofilizzate di *Oenococcus oeni* sono state lavate con soluzione isotonica (0.9 % NaCl) e centrifugate a 11000 rpm per 15 minuti per separare il pellet dal surnatante. Questo trattamento è stato ripetuto fino all'ottenimento di un surnatante limpido, successivamente le due fasi vengo allontanate e conservate a -20°C . Prima di essere impiegate, le cellule congelate sono state risospese in 0.9 % NaCl con un valore iniziale di $\text{OD}_{360\text{nm}}$ di 2.0 (S). Aliquote di S (0.5 – 2.5 ml) sono state miscelate con 0.25 mL di saccarosio (0.27 M), 0.25 ml di tampone McIlvaine e NaCl 0.9% fino a volume finale di 3 mL.

Questo substrato è stato, infine, equilibrato per un'ora.

3.2.6.2 Determinazione dell'attività di HEWL libero in tampone McIlvaine

La reazione litica è stata condotta in cuvette da 3 mL con cammino ottico 1 cm usando uno spettrofotometro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 25. Il saggio d'attività inizia con l'aggiunta di 0.1 mL di HEWL (1 mg mL^{-1}) a 3 mL del substrato.

Per calcolare l'attività enzimatica, il decremento di OD_{360nm} (ΔOD_{360nm}) è stato misurato. La parte lineare della curva (tra OD_{360nm} e tempo) in unità di OD_{360nm} per minuto fornisce l'unità enzimatica (U). Un bianco senza HEWL è stato condotto per considerare eventuali decrementi di OD dovuto a cause di origine non enzimatica.

L'unità dell'attività biologica (U) e l'attività specifica di HEWL libero (FSA), precedentemente descritti, sono stati determinati come illustrato di seguito:

$$U = ((\Delta OD \text{ min}^{-1} - \Delta OD \text{ min}^{-1} \text{ bianco}) 10^3)$$
$$FSA = U \text{ mg}^{-1} \text{ HEWL libero}$$

3.2.6.3 Determinazione dell'attività di HEWL immobilizzato – batch mode

L'attività di HEWL immobilizzato è stata determinata aggiungendo le sfere funzionalizzate al substrato di reazione (cellule liofilizzate di *Oenococcus oeni* sciolte in vino modello) e poste in agitazione a 50 rpm.

Dopo 30 minuti la sospensione cellulare è stata separata, il valore di OD del substrato è stato misurato prima e dopo il trattamento per calcolare l'attività.

Come per la forma libera, un bianco compiuto con sfere senza HEWL è stato condotto per considerare eventuali decrementi di OD non attribuibili all'enzima.

L'attività specifica (ISA) e l'attività specifica relativa (RA%) di HEWL immobilizzato sono stati determinati come illustrato di seguito:

$$ISA = U \text{ mg}^{-1} \text{ HEWL immobilizzato}$$
$$RA \% = ((ISA FSA^{-1}) 100)$$

La stabilità operativa di HEWL immobilizzato è stata determinata in 8 cicli di lavoro a 25° C per 4 giorni. Dopo ciascun ciclo i biocatalizzatori immobilizzati sono stati lavati con tampone fosfato (0.1 mM, pH 7), conservati a 4° C e periodicamente analizzati per l'attività catalitica. Le medesime condizioni operative sono state ripetute per la stima della % di attività ritenuta e di HEWL rilasciato ad ogni ciclo di lavoro.

3.2.6.4 Studio cinetico di HEWL libero

Il saggio di torbidità è stato utilizzato per misurare FSA *versus* concentrazione di substrato espresso come millilitri di substrato iniziale (S) aggiunto al mezzo di incubazione. I parametri cinetici apparenti sono stati stimati usando le equazioni di regressione non lineare, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Hanes-Woolf.

3.2.6.5 Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati svolti effettuando tre repliche e i risultati riportati nei paragrafi successivi rappresentano la loro media ($\pm$ deviazione standard). I dati sono stati elaborati usando il programma statistico GraphPad Prism versione 5.0.

4.0 Risultati e Discussione

4.1 Scelta del substrato

La morfologia delle cellule liofilizzate di *Oenococcus oeni* non è risultata omogenea, infatti in figura 20 è visibile la presenza di cellule dalla forma allungata.

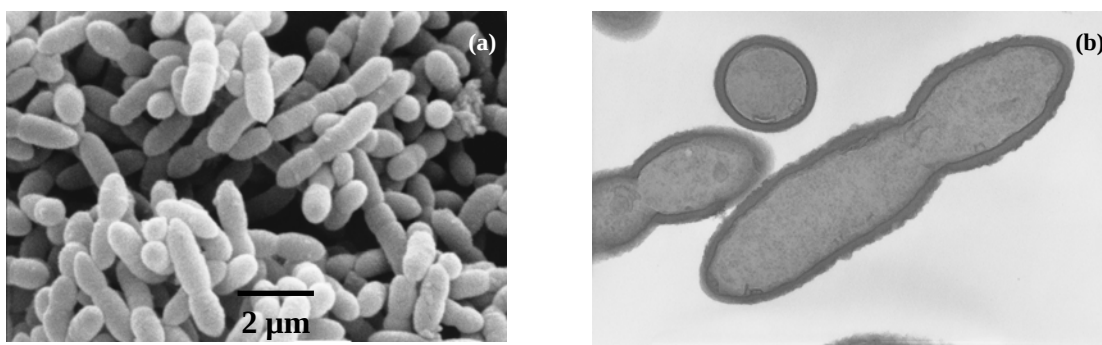


Figura 20: micrografici di cellule di *Oenococcus oeni* ottenuti mediante microscopio elettronico a scansione, SEM, (a) e microscopio elettronico a trasmissione, TEM, (b).

La sospensione di cellule di *Oenococcus oeni* in tampone McIlvaine ha mostrato una buona stabilità spettrofotometrica ($\Delta OD_{360 \text{ nm}} \text{ min}^{-1} < 10^{-3}$) in un ampio intervallo di pH (3.0 – 9.6) che non ha influenzato il saggio di cinetica enzimatica; tuttavia è stato necessario un tempo di reazione più lungo con HEWL libero ed immobilizzato a causa della minore sensibilità rispetto al metodo più comunemente impiegato.

4.2 Determinazione dell'attività di HEWL libero in tampone McIlvaine

Nel preparato commerciale HEWL, è stata misurata una purezza del 98.4 % di proteine.

L'attività litica di HEWL in forma libera è risultata dipendente dal pH (Fig. 21a). Il netto profilo mostra un massimo a 4.5 ed una perdita di attività maggiore dell' 80% a pH 3.2.

In figura 21b è illustrato l'andamento di FSA in funzione del substrato a pH 4.5 (*optimum*), 3.5 e 3.2.

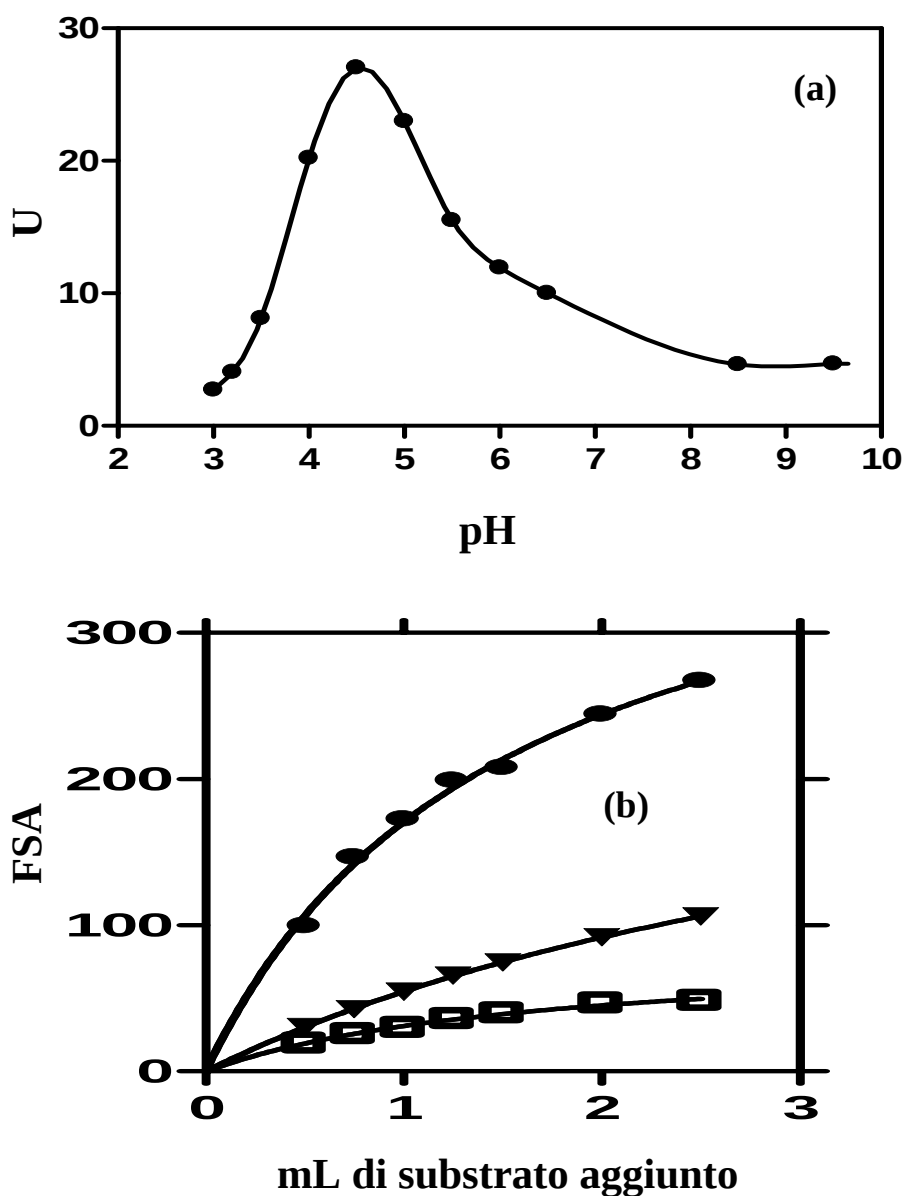


Figura 21: (a) profilo di attività in funzione del pH di HEWL (32.26 ppm) in una soluzione di substrato ottenuta con cellule di *Oenococcus oeni* in tampone McIlvaine a 25 °C ed equilibrato a diversi valori di pH; (b) FSA versus concentrazioni di substrato (mL di substrato aggiunto) a diversi valori di pH (4.5 ●, 3.5 ▲ and 3.2 □).

Le curve cinetiche di saturazione, costruite sulla base dell'equazione di Michaelis-Menten, sono state ottenute impiegando 2.5 mL di substrato. I parametri cinetici apparenti ottenuti (Tab. 8) sono stati:

- ✓ $V_{\max app} = FSA_{\max app}$;
- ✓ $K_{cat app} = V_{\max app} \mu M^{-1}$ HEWL libero;
- ✓ $K_a app = K_{cat app} K_m app^{-1}$

Tabella 8: Parametri cinetici apparenti di HEWL libero (72 μM) at 25 °C.

pH	$V_{\max \text{ app}}(\text{FSA}_{\max \text{ app}})$	$K_{\text{cat app}}(\text{s}^{-1})$	$K_{\text{a app}}(\text{s}^{-1} \text{ ml}^{-1})$
4.5	429.1 ± 57.45	6.0	3.9
3.5	285.8 ± 4.63	4.0	1.0
3.2	82.7 ± 7.9	1.1	0.7

I valori di $K_{\text{cat app}}$ in funzione del pH sono stati espressi in forma logaritmica (Fig.22). Nell'intervallo di bassi valori di pH, il valore del Log $K_{\text{cat app}}$ si riduce fortemente a pH 3.2. Questo comportamento, limitante per le applicazioni di HEWL in ambienti acidi (pH < 3.5), potrebbe essere spiegato dalla parziale protonazione di Asp 52, uno dei due aminoacidi chiave del sito attivo di HEWL, che si verifica al di sotto di pH 3.5 (Nielsen and McCammon, 2003).

Tuttavia, i complessi profili di pH osservati per le proprietà catalitiche di HEWL usando substrati cellulari, sono attribuibili a percorsi di reazione più complessi di quelli ottenuti con oligosaccaride di *N*-acetilglucosamina, che risulta il substrato più ampiamente impiegato per lo studio del lisozima all'equilibrio, stato stazionario e pre-stato stazionario (Imoto *et al*, 1972; Banerjee *et al*, 1975).

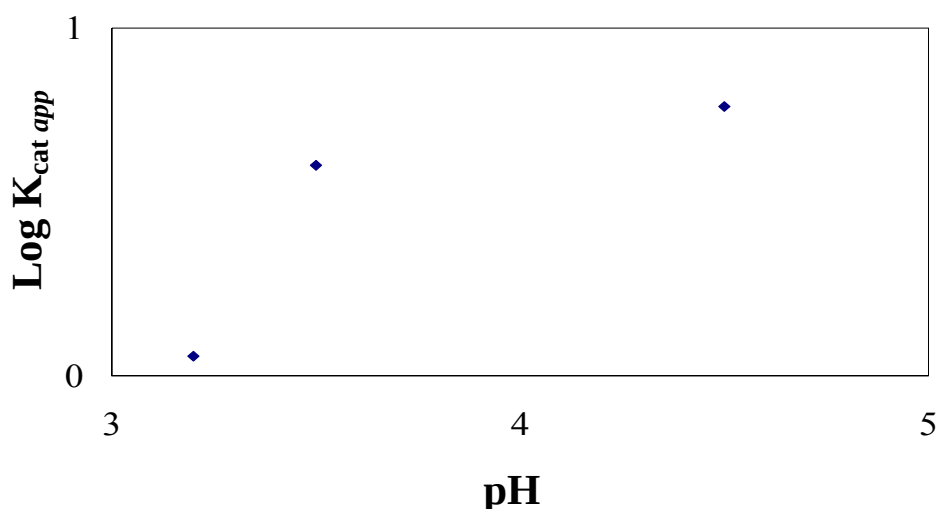


Figura 22: Log $K_{cat\ app}$ versus pH.

4.3 Determinazione dell'attività di HEWL libero ed immobilizzato in vino modello

La coltura *starter* liofilizzata di *Oenococcus oeni* è stata sospesa in vino modello (etanolo 12% v/v in acqua con aggiunta di acido tartarico, 5 g L⁻¹, pH corretto a 3.2 con NaOH) ed equilibrata per almeno un'ora.

Come per il tampone McIlvaine, la sospensione ha mostrato una buona stabilità spettrofotometrica a 600 nm ($\Delta OD_{600nm} \text{ min}^{-1} < 10^{-3}$).

Le concentrazioni di substrato (S_0) sono state espresse come OD_{600nm} per convenienza. Il valore di OD_{600nm} della sospensione cellulare di *Oenococcus oeni* prima del trattamento con HEWL libero è stato registrato e messo in relazione a FSA, la reazione litica è stata condotta come descritto precedentemente per il tampone McIlvaine.

Il decremento della densità ottica a 600 nm (ΔOD_{600nm}) è stato registrato tra il primo ed il secondo minuto di reazione (parte lineare della curva) per HEWL libero, mentre un tempo di reazione più lungo (30 minuti) è stato necessario per HEWL immobilizzato.

In figura 23, dati sperimentali di FSA vs S_0 , mostrano una curva con andamento a campana, che è tipico per inibizione da substrato. Tuttavia una buona linearità di risposta è stata ottenuta con valori di OD_{600nm} entro 0.8.

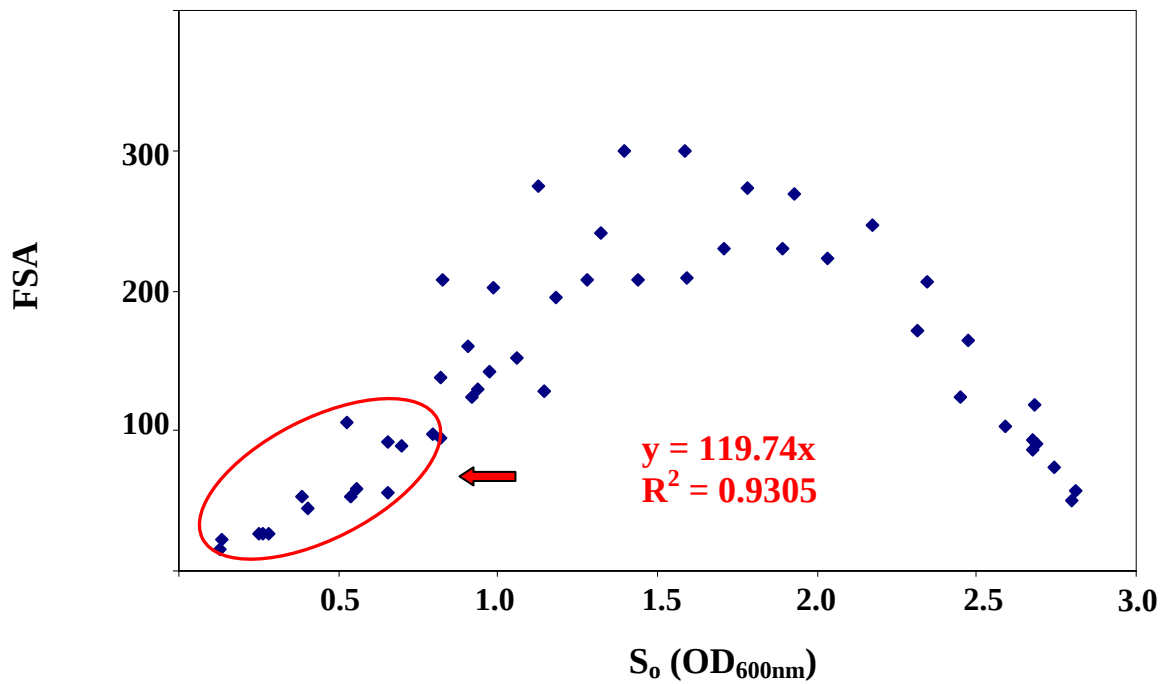


Figura 23: tipico profilo di inibizione da substrato di FSA

Conseguentemente, i saggi di FSA e ISA sono stati condotti diluendo la sospensione cellulare di *Oenococcus oeni* in vino modello fino ad un valore di OD_{600nm} compreso tra 0.6 e 0.65, corrispondente ad un numero approssimativo di $6 \cdot 10^9$ cellule mL^{-1} (Fig. 24).

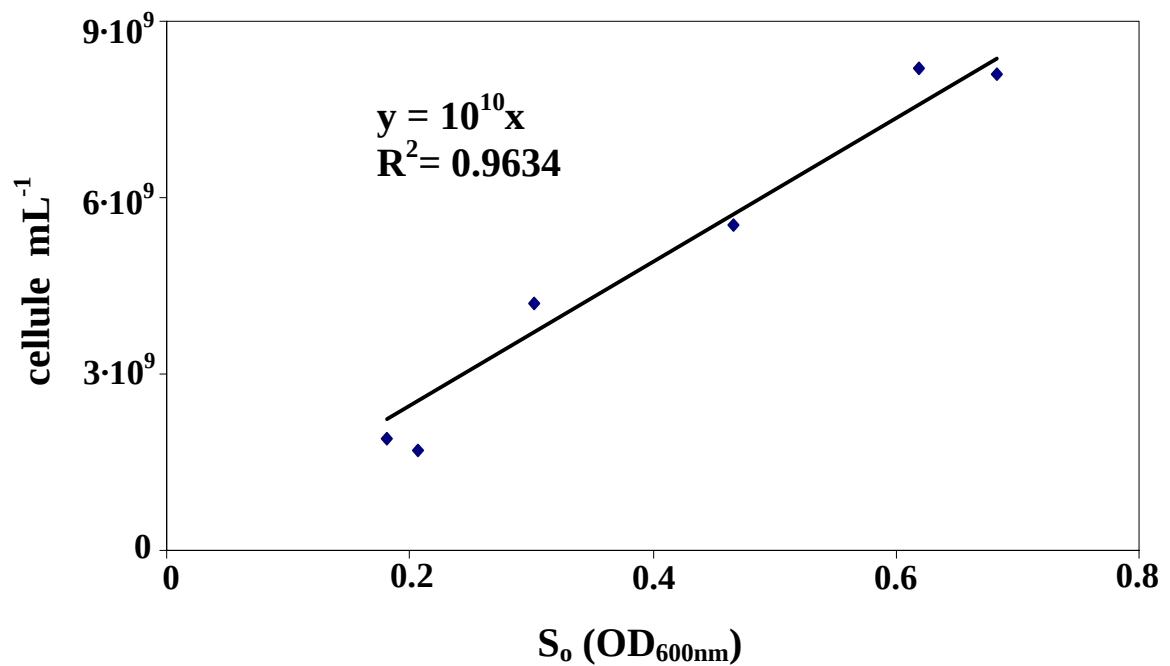


Figura 24: cellule di *Oenococcus oeni* (cellule mL^{-1}) vs OD_{600nm} .

La relazione lineare, riportata in figura 24 e relativa ai campioni di cellule di *Oenococcus oeni* vs OD_{600nm}, è stata ottenuta sulla base del metodo dell'acridine orange descritta da Corich *et al.* (2004).

4.4 Determinazione dell'attività di HEWL immobilizzato – *batch mode*

Il lisozima immobilizzato su sfere magnetiche è stato maggiore per CB (13.9 µg mg⁻¹ di resina secca) rispetto a TAB (9.7 µg mg⁻¹ di resina secca), ciò potrebbe essere dovuto alla più alta densità di gruppi reattivi presenti sulla superficie di CB rispetto TAB (Tabella 9).

Tabella 9: Caratteristiche dei supporti attivati con HEWL.

Supporto	Metodo di immobilizzazione	HEWL legato (µg mg ⁻¹ resina secca)	RA (%)	ISA (g ⁻¹ resina secca)
TAB	No spacer	9.7	7.6	1740
CB	No spacer, EDC	13.9	5.6	1539
IB	No spacer	78.63	n.d.	n.d.
IB-PEG 1000	PEG 1000, EDC	28.47	2.2	15.8
IB-PEG 3350	PEG 3350, EDC	28.18	3.5	25.1
IB-PEG 8000	PEG 8000, EDC	19.73	8.6	61.8
IB-PEG 20000	PEG 20000, EDC	16.38	7.3	52.4

n.d. : non determinabile.

Tuttavia, TAB ha mostrato una migliore attività catalitica rispetto a CB, i siti di legame dell'enzima su TAB, probabilmente lontani dal suo sito attivo, potrebbero aver minimizzato l'interferenza sterica tra supporto ed enzima immobilizzato.

L'introduzione di *spacer* molecolari sulla superficie di IB ha influenzato la quantità di HEWL legato ai supporti nonché l'attività relativa del biocatalizzatore, questi effetti assumono una rilevanza maggiore soprattutto se si confrontano i dati ottenuti per i campioni IB-PEG 8000 con quelli misurati per IB/No *spacer*.

La diminuzione della quantità di HEWL immobilizzato, favorisce un incremento dell'attività relativa che raggiunge valori pari a 8.6% nei campioni IB-PEG 8000. Presumibilmente, questo effetto potrebbe essere, ancora una volta, ricondotto alla

diminuzione dell'impedimento sterico. Le cellule impiegate come substrato di reazione, infatti, non hanno libero accesso al sito attivo dell'enzima soprattutto quando quest'ultimo è direttamente legato al supporto.

Per quanto riguarda l'attività specifica (ISA), le sfere magnetiche sono risultate i supporti che hanno prodotto i biocatalizzatori con la più elevata attività catalitica per grammo di resina secca.

4.5 Stabilità di HEWL immobilizzato

La stabilità operativa di un sistema di HEWL immobilizzato è fondamentale per applicazioni in campo alimentare. La figura 25 mostra i risultati dello studio di stabilità di HEWL immobilizzato. L'attività catalitica è stata monitorata come descritto precedentemente.

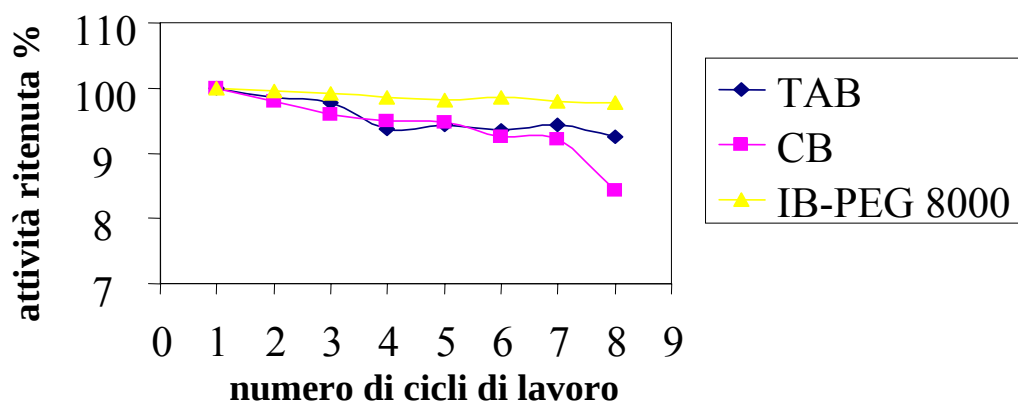


Figura 25: ripetuti cicli di lisi cellulare di *Oenococcus oeni* con HEWL immobilizzato su TAB, CB e IB-PEG 8000

Dopo l'ottavo ciclo, tutti i biocatalizzatori immobilizzati hanno conservato l'85% della loro attività catalitica originale, dimostrando una buona stabilità operativa. Inoltre, non è stata rilevata alcuna traccia di HEWL nei lavaggi successivi al saggio d'attività enzimatica, questo ha permesso di convalidare l'ipotesi che il legame covalente tra enzima e carrier (Fig. 26) favorisce la formazione di biocatalizzatori stabili.

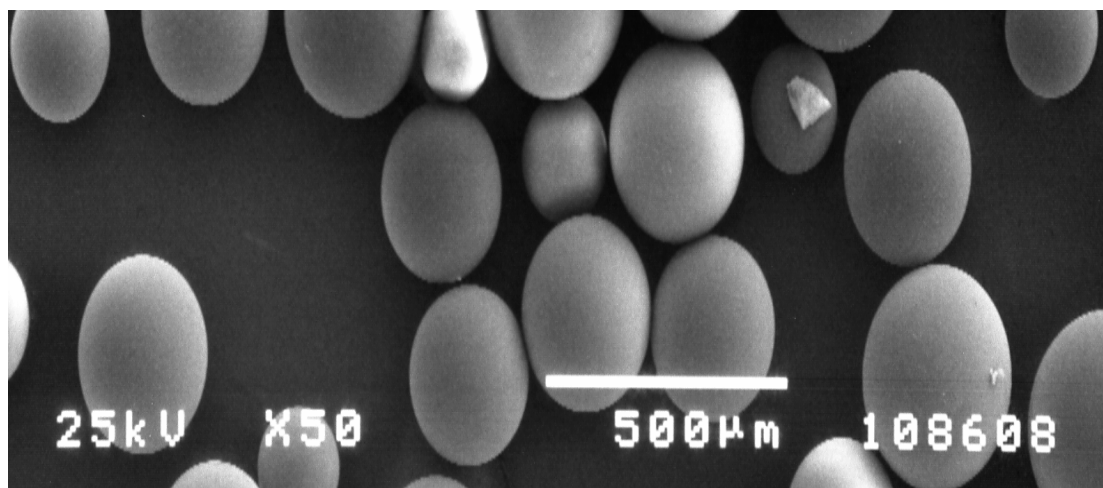


Figura 26: immagine ottenute mediante SEM di IB-PEG 8000 dopo l'ottavo ciclo di lavoro.

5.0 Conclusioni

I risultati riportati, hanno dimostrato che una preparazione commerciale ad uso enologico di *Oenococcus oeni*, può essere usata per la misura dell'attività enzimatica di HEWL libero ed immobilizzato in soluzioni caratterizzate da bassi valori di pH, tipici di differenti alimenti.

L'attività litica di HEWL libero è risultata fortemente influenzata dal pH, con una perdita d'attività pari all'80% a pH 3.2 rispetto al massimo (pH 4.5).

Oggetto di questa tesi di dottorato è stato lo studio delle caratteristiche di HEWL immobilizzato su supporti insolubili, l'impiego di diverse tipologie di supporti ha messo in evidenza come le caratteristiche chimico-fisiche dei supporti hanno assunto un ruolo fondamentale sia in fase di immobilizzazione che di *performance* del biocatalizzatore.

Le sfere magnetiche carbossi-attivate hanno mostrato maggiori quantità di HEWL immobilizzato rispetto alle sfere magnetiche tosil-attivate, che sono state caratterizzate da una migliore attività enzimatica misurata in termini di attività specifica relativa (RA%).

HEWL immobilizzato su supporti macroporosi (IB), utilizzando polietilenglicole (PEG), ha dimostrato che l'impiego di *spacer* molecolari è in grado di aumentare la lisi cellulare di *Oenococcus oeni*, rispetto a quanto misurato per HEWL immobilizzato direttamente sul supporto senza PEG. Questo comportamento può essere spiegato dalle limitazioni del trasferimento di massa durante la reazione enzimatica e/o HEWL potrebbe essere immobilizzato in forma inattiva.

Tuttavia, sebbene utilizzando PEG l'attività relativa è aumentata, il valore più elevato ottenuto è risultato leggermente più alto rispetto a quanto misurato per le sfere magnetiche non porose.

L'impiego delle sfere magnetiche ha prodotto il biocatalizzatore immobilizzato con la più alta attività catalitica per grammo di *carrier* secco.

Comunque, tutti i sistemi di immobilizzazione di HEWL hanno mostrato una buona attività ritenuta (%), che potrebbe renderli idonei per l'utilizzo in ripetuti cicli di lisi batterica per il trattamento del vino durante la vinificazione.

Infine, i dati ottenuti suggeriscono che sono necessari studi sui limiti dovuti alla diffusione, impedimento sterico, formazione di legami multipli fra enzima e supporto e legami fra supporto ed amminoacidi coinvolti nell'attività catalitica dell'enzima, a causa della bassa attività specifica relativa del biocatalizzatore immobilizzato.

BIBLIOGRAFIA

- Banerjee SK, Holler E, Hess GP, Rupley JA (1975) Reaction of N-acetylglucosamine oligosaccharides with lysozyme. Temperature, pH, and solvent deuterium isotope effects; equilibrium, steady state, and pre-steady state measurements. *Journal of Biological Chemistry* **250**: 4355-67.
- Benucci I (2007) *Immobilizzazione di proteasi acide per applicazioni in vino modello*. Tesi di laurea di II livello. Università degli Studi della Tuscia. Viterbo.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-54.
- Blake CCF, Koenig DF, Mair GA, North ACT, Phillips DC, Sarma VR (1965) Structure of hen egg-white lysozyme. A three dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* **206**: 757-61.
- Blake CCF, Johnson LN, Mair GA, North ACT, Phillips DC, Sarma VR (1967) Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proceeding of the Royal Society London Ser. B* **167**: 378-88.
- Bourdineaud JP, Nehmé B, Tesse S, Lonvaud-Funel A (2003) The *ftsH* Gene of the Wine Bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Applied and Environmental Microbiology* **69** (5): 2512-20.
- Cabral JMS, Best D, Boross L, Tramper J (1994) *Applied Biocatalysis*. Harwood Academic Press, Switzerland.
- Carini S, Mucchetti G, Neviani E (1985) Lysozyme: activity against clostridia and use in cheese production-a review. *Microbiologie, Aliments, Nutrition* **3**: 299-320.
- Carme Masque M, Bordons A (1996) Isolation and selection of malolactic bacteria from southern Catalan wines. *Journal Wine Research* **7**: 91-101.
- Chen JP, Chen YC (1997) Preparations of immobilized lysozyme with reversibly soluble polymer for hydrolysis of microbial cells. *Bioresource Technology* **60**: 231-7.
- Corich V, Soldati E, Giacomini A (2004) Optimization of fluorescence microscopy techniques for the detection of total and viable lactic acid bacteria in whey starter cultures. *Annals of Microbiology* **54** (3): 335-42.
- Cunningham FE, Proctor VA, Goetsch SJ (1991) Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. *World's Poult Science Journal* **47**: 141-63.
- Davis CR, Wibowo D, Eschenbruch R, LEE TH, Fleet GH (1985) Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* **36**: 290-301.
- Dicks LMT, Dellaglio F, Collins MD (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 395-7.
- Edwards CG (1992) Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington state wines: *Pediococcus* spp. *American Journal of Enology and Viticulture* **43**: 233-8.
- Gerbaux V, Meistermann E, Cottureau P, Barriere C, Cuinier C, Berger JL, Villa A (1999) Use of lysozyme in enology. *Bulletin de l'O.I.V.* **72**: 348-73.
- Gerbaux V, Villa A, Monamy C, Bertrand A (1997) Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* **48**: 49-54.
- Guzzo J, Jobin MP, Diviès C (1998) Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiology Letters* **160**: 43-7.

- Hasselberg FX (1978) in: Use of Enzymes and Immobilized Enzyme, p.128, Nelson-Hall, Chicago, IL.
- Hendrickson JB, Cram DJ, Hammond GS (1973) *Chimica organica*. Casa editrice: Piccini Editore, Padova.
- Hodsdon JM, Brown GM, Sieker LC, Jensen LH (1990) Refinement of triclinic lysozyme: I. Fourier and least-squares methods. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science* **46**: 54-62.
- Imoto T, Johnson LN, North ACT, Phillips DC, Rupley JA (1972) *The enzymes* 3rd Ed, Vol. 7, pp665-868, Academic Press, New York.
- Izuagbe YS, Dohman TP, Sandine EE, Heartherbell DA (1985) Characterization of *Leuconostoc oenos* isolated from Oregon wines. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 680-4.
- Kirby AJ (2001) The lysozyme mechanism sorted — after 50 years. *Nature Structural Biology* **8** (9): 737-9.
- Kokoshis PL, Williams DL, Cook JA, Di Luzio NR (1978) Increased resistance to *Staphylococcus aureus* infection and enhancement in serum lysozyme activity by glucan. *Science* **199**: 1340-2.
- Lilly MD (1992) *The design and operation of biotransformation process*. Kluwer Academic, Amsterdam.
- Liu SQ, Pritchard GG, Hardman MJ, Pilone GJ (1996) Arginine catabolism in wine lactic bacteria: is it via the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway? *Journal Applied Bacteriology* **81**: 486-92.
- Lonvaud-Funel A (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antoine Leewenhoek* **76**: 317- 331.
- Masschalck B, Michiels CW (2003) Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **29**: 191-214.
- Miller TE (1969) Killing and lysis of Gram-negative bacteria through the synergistic effect of hydrogen peroxide, ascorbic acid and lysozyme. *Journal Bacteriology* **98**: 949-55.
- Moult J, Yonath A, Traub W, Smilansky A, Podjarny A, Rabinovich D, Saya A (1976) The structure of triclinic lysozyme at 2.5 Å resolution. *Journal Molecular Biology* **100**: 179-95.
- Nelson DL, Cox MM (2003) *Introduzione alla biochimica di Lehninger*. Casa editrice: Zanichelli.
- Nielsen JE, McCammon JA (2003) Calculating pKa values in enzyme active sites. *Protein Science* **12**: 1894-1901.
- Nielsen JC, Richelieu M (1999) Control of flavour development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (2): 740-5.
- Nilsson K, Mosbach K (1980) p-Toluenesulfonyl chloride as an activating agent of agarose for the preparation of immobilised affinity ligands and protein. *European Journal Biochemistry* **112**: 397- 402.
- Osserman EF, Klockars M, Halper J, Fisher RE (1974) in: *Lysozyme*, Academic Press, New York.
- Padgett T, Han IY, Dawson PL (1998) Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal Food Protection* **61**:1330-5.
- Pilatte E, Nygaard M, Gao YC, Krentz S, Power J, Lagarde G (2000) Etude de l'effet du lysozyme sur différentes souches d'*Oenococcus oeni*. Applications dans la gestion de la fermentation malolactique. *Revue Française d'Oenologie* **185**: 26-9.
- Pitotti A, Dal Bo A, Boschelle O (1991) Assay of lysozyme by its lytic action on *Leuconostoc oenos*: a suitable substrate at acidic pH. *Journal of Food Biochemistry* **15**: 393-403.
- Proctor VA, Cunningham FF (1988) The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **26**: 359-95.

- Ratledge C, Kristiansen B (2004) *Biotechnologie di base*. Casa editrice: Zanichelli.
- Shugar D, (1952) The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta* **8**: 302-9.
- Song Y, Babiker EE, Usui M, Saito A, Kato A (2002) Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan–lysozyme conjugates. *Food Research International* **35**: 459-66.
- Thakur A, Chauhan A, Willcox MD (1999) Effect of lysozyme on adhesion and toxin release by *Staphylococcus aureus*. *Journal Ophthalmology* **27**: 224-7.
- Valenta C, Schwarz E, Bernkop-Schnurch A (1998) Lysozyme-caffeic acid conjugates: possible novel preservatives for dermal formulations. *International Journal Pharmacology* **174**: 125-32.
- Verga R, Pilone MS (2002) *Biochimica industriale. Enzimi e loro applicazioni nella bioindustria*. Casa editrice: Springer, Milano.
- Zacchigna M, Di Luca G, Lassiani L, Varnavas A, Pitotti A, Boccù E (1999) Improved activity in acidic media of immobilized lysozyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **76**: 171- 181.
- Zimmerli B, Schlatter J (1991) Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutation Research* **259**: 325-50.
- Jolles J, Jolles P (1984) What is new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Molecular and Cellular Biochemistry* **63**: 165-89.

SITOGRAFIA

Berzelius J.J. <http://www.minerva.unito.it/Storia/bio%20HTML/Berzelius.html>

WIKIPEDIA. Pagina Web: www.wikipedia.it/ 2007.