MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

| DOMANDA NUMERO | 101995900436503 |
|---|---|
| Data Deposito | 21/04/1995 |
| Data Pubblicazione | 21/10/1996 |

| Sezione | Classe | Sottoclasse | Gruppo | Sottogruppo |
|---|---|---|---|---|
| C | 12 | G | | |

Titolo

PROCEDIMENTO DI IMMOBILIZZAZIONE DI UNA FRAZIONE ENZIMATICA EXTRACELLULARE PER IL TRATTAMENTO DI MOSTI, VINI, ALTRE BEVANDE OTTENUTE DA FRUTTA E PER LA PRODUZIONE DI AROMI NATURALI.

RM95 A 000256

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per l'invenzione industriale dal titolo

**Procedimento di immobilizzazione di una frazione enzimatica extracellulare per il trattamento di mosti, vini, altre bevande ottenute da frutta e per la produzione di aromi naturali;**

a nome del **CONSIGLIO NAZIONALE delle RICERCHE, in ROMA**

**Inventori: Iolanda Rosi e Paolo Riccio**

L'invenzione presentata riguarda un procedimento per la concentrazione, purificazione ed immobilizzazione "one step" di una frazione β-glucosidasica, con caratteristiche aromatizzanti nei vini, nei succhi di frutta e per la produzione di aromi naturali.

La β-glucosidasi prodotta e rilasciata da un ceppo di *Debaryomyces hansenii* è risultata non inibita da alte concentrazioni di glucosio o di etanolo, né da valori bassi di pH e di temperatura, proprietà che la rendono interessante nel campo delle biotecnologie dei processi fermentativi, per la sua capacità di liberare il patrimonio aromatico intrinseco di mosti, di vini e di altre bevande a base di frutta. Tale enzima, normalmente presente in concentrazione molto diluita nel sovranatante cellulare, è stato concentrato, parzialmente purificato ed immobilizzato con un procedimento "one-step" per adsorbimento su idrossiapatite (HTP). Tale procedimento è semplice, rapido, rinnovabile ed economico. La resina utilizzata, assolutamente naturale, non è tossica e non determina problemi di stoccaggio e di eliminazione. L'enzima è attivo e stabile, sia in forma libera, che in forma immobilizzata. L'enzima immobilizzato può essere separato

facilmente e riutilizzato per catalizzare l'idrolisi di glicosidi terpenici e liberare la frazione agliconica odorosa, con attività e specificità superiori a quelle mostrate dalle preparazioni commerciali pectolitiche attualmente disponibili.

A seguito di ricerche condotte per mettere in evidenza la presenza di un'attività β-glucosidasica in lieviti di interesse enologico, gli Inventori sono riusciti a selezionare un ceppo di *Debaryomyces hansenii* in grado di produrre nel mezzo di crescita una β-glucosidasi. Studi condotti nel surnatante colturale hanno dimostrato che, a differenza di altri simili prodotti enzimatici, l'enzima prodotto da questo lievito non è inibito da alte concentrazioni di glucosio o di etanolo, non è influenzato da valori bassi di pH e di temperatura. Queste caratteristiche sono risultate molto interessanti per un suo impiego nel trattamento di mosti, vini e altre bevande ottenute da frutta, al fine di aumentarne il carattere varietale per liberazione di composti odorosi (soprattutto terpenoli), dalla frazione glicosidica inodore. Pertanto la β-glucosidasi contenuta nel surnatante colturale di un ceppo di *Debaryomyces hansenii* è stata concentrata tramite l'applicazione "batch-wise" della cromatografia per adsorbimento su idrossiapatite (HTP) e purificata.

L'enzima immobilizzato su HTP può essere ripetutamente utilizzato per liberare i monoterpeni dai complessi glicosidici, inodori, presenti nei mosti o nei vini o in altri tipi di frutta o per produrre aromi "naturali" da aggiungere agli alimenti.

Le β-glucosidasi sono enzimi appartenenti alla classe delle glicoidrolasi, EC 3. 2. 1., in grado di rimuovere zuccheri da esteri glicosilati. In particolare, le β-glucosidasi, EC 3.2.1.21, sono caratterizzate dalla loro capacità di idrolizzare i legami β-glicosidici con una specificità più o meno ampia.

Questi enzimi, prodotti da microrganismi come batteri, protozoi, funghi e lieviti, permettono la conversione di composti vegetali complessi in altri più semplici.

L'interesse per questi enzimi, nel campo delle bevande fermentate, in particolare nel vino, è legato alla capacità di idrolizzare i complessi glicosidi dei terpeni da mosto d'uva e di altri frutti e da vino con rilascio di diversi terpenoli (geraniolo, nerolo, α-terpineolo, linalolo, citronellolo).

Dopo sviluppo, il brodo colturale viene filtrato attraverso un filtro in acetato di cellulosa (Millipore 0.45 m diametro dei pori), il filtrato viene utilizzato come fonte extracellulare di enzima.

Questi composti, che fanno parte della classe dei terpeni, sono all'origine della varietà dell'aroma nei succhi di frutta e nei vini. Tuttavia molti di questi terpenoli sono legati in una forma glicosidica priva di aroma. L'espressione dell'attività aromatica è possibile soltanto in seguito alla liberazione dell'aglicone volatile. Ciò avviene in due tempi [1]: dapprima c'è l'intervento di idrolasi che separano il glucosio dallo zucchero terminale, successivamente una β-glucosidasi deve scindere il legame fra l'aglicone ed il glucosio per liberare tutto il potenziale aromatico.

La β-glucosidasi da *Debaryomyces hansenii* sembra essere interessante in quanto studi, effettuati sui sovranatanti cellulari di questo lievito, hanno dimostrato che l'attività β-glucosidasica rilasciata, a differenza di altri simili prodotti enzimatici, non è inibita da alte concentrazioni di etanolo o di glucosio e non è influenzata da valori bassi di pH e temperatura [2].

L'invenzione presentata riguarda un procedimento originale "one-step" per il recupero, la concentrazione, la purificazione e l'applicazione continuata in forma

immobilizzata dell'attività β-glucosidasica prodotta dal lievito. Il prodotto ottenuto, cioè l'enzima immobilizzato per adsorbimento su una resina di fosfato di calcio, può essere utilizzato per arricchire la frazione aromatica dei vini e di altre bevande a base di frutta e per ottenere aromi naturali da aggiungere agli alimenti.

Come è noto, i monoterpeni come geraniolo, nerolo, a-terpineolo, linalolo, sono sostanze volatili, appartenenti alla classe dei terpeni, che rivestono un ruolo importante nel definire il "flavour" (gusto e aroma) delle uve, dei vini e di altri tipi di frutta. Tali composti sono presenti in questi substrati in grande misura legati a degli zuccheri, formando così un complesso glicosidico privo di odore. Per la liberazione di questo patrimonio aromatico "bloccato", l'idrolisi enzimatica è risultata la più promettente. Infatti, studi precedenti [3], [4] hanno messo in evidenza che l'applicazione dell'idrolisi acida per la liberazione dei terpenoli dai complessi glicosidici dava origine a composti con modificato carattere aromatico. Varie preparazioni enzimatiche (sia di origine vegetale che fungina) sono state usate per idrolizzare il complesso glicosidico delle uve. Tuttavia le β-glucosidasi prodotte dalle piante (uva, mandorle) erano caratterizzate da una stretta specificità nei riguardi dell'aglicone: erano poco attive a pH acidi ed inibite da concentrazioni di glucosio al di sopra dell'1% [5] [6]. Anche le preparazioni enzimatiche di origine fungina (*Aspergillus niger)* erano sensibili alla concentrazione di glucosio del mezzo [7]. Alcune preparazioni enzimatiche commerciali, essenzialmente enzimi pectolitici con attività collaterale β-glucosidasica, ottenute da funghi (*Aspergillus niger*) sono risultate in grado di incrementare l'aroma varietale del vino. Tuttavia la presenza di altre

attività enzimatiche quali polifenolossidasi, che in presenza di ossigeno può cambiare il colore del vino [8], o l'attività idrolitica nei riguardi degli acidi cinnammici in forma esterificata con liberazione degli acidi ferulico e p-cumarico [9], che diventano substrati per la formazione di "off-odors" nei vini, rendono abbastanza problematico il loro uso per la liberazione di aromi varietali.

Il procedimento, oggetto dell'invenzione presentata, viene di seguito descritto, a scopo orientativo e non limitativo. Di esso si descrive una versione da considerarsi attualmente preferita dagli Inventori, essendo possibile infatti, che alcuni particolari possano essere modificati senza cambiarne però l'aspetto più significativo e cioè l'ottenimento della concentrazione, purificazione ed immobilizzazione di una frazione β-glucosidasica con le caratteristiche desiderate.

**La Fig. 1**, allegata, è riportata al solo scopo dimostrativo. Si tratta di "elettroforesi in SDS su gel di policrilammide".

Il ceppo di lievito utilizzato è il *Debaryomyces hansenii* 4025 DBVPG, precedentemente selezionato perché dotato di elevata attività β-glucosidasica extracellulare, costitutiva e non repressa da glucosio [2].

Il lievito viene fatto sviluppare in un terreno sintetico contenente Yeast Nitrogen Base (Difco) 0.67%, glucosio 0.5%, tween 80 0.025%, tamponato a pH 5 con tampone tartrato fosfato 0.1 M. Il terreno viene sterilizzato per filtrazione su filtri di acetato di cellulosa (Millipore, 0,22 mm). La crescita avviene in aerobiosi in beute riempite per un decimo del loro volume, poste in agitatore orbitale a 150 rpm, alla temperatura di 25°C per 20 h.

Viene quindi allestita una precoltura facendo sviluppare le cellule per 24 h nel terreno e nelle condizioni d'incubazione sopra descritte. L'inoculo viene preparato centrifugando la coltura a 10000 rpm a 4°C per dieci min. e le cellule residue vengono lavate per due volte con soluzione fisiologica sterile (NaCl 0.85 %). Tali cellule vengono risospese in soluzione fisiologica sterile e la sospensione viene impiegata per l'inoculo in modo tale da avere una coltura con un valore di densità ottica iniziale, misurata a 600 nm, pari a 0,2.

L'attività β-glucosidasica presente nel surnatante colturale è dosata usando come substrato il p-nitrofenil-β-d-glucopiranoside (pNPG) e sfruttando la seguente reazione:

$$pNPG + H_2O = Glucosio + pNP$$

Il p-nitrofenolo (pNP), liberato durante la reazione, assorbe ad una lunghezza d'onda di 400 nm rendendone possibile la quantificazione per via spettrofotometrica (spettrofotometro Beckman DU-65) seguendo la procedura precedentemente messa a punto [2]. L'attività enzimatica è espressa in UE/ml di surnatante o di filtrato.

Il dosaggio delle proteine è stato effettuato con il reattivo di Bradford ed il metodo BIO-RAD, utilizzando l'albumina da siero bovino (BSA) come standard. La concentrazione del BSA viene determinata spettrofotometricamente a 279 nm sfruttando il coefficiente di estinzione $e^{1\%} = 6.56$ a 279 nm.

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide in sodio dodecil-solfato (SDS-PAGE) è effettuata con la procedura di Schägger e von Jagow [10], utilizzando gels di 1.5 mm al 6% di acrilamide. I campioni devono essere concentrati per

ultrafiltrazione, o liofilizzazione, o mediante precipitazione con acetone freddo prima della solubilizzazione con l'SDS. L'incubazione avviene a temperatura ambiente. La corsa viene effettuata per un tempo inferiore alle tre ore su mini apparecchiature Hoefer o Bio-Rad termostatando a 4°C. Le proteine standard (range 14,4-97.4 kDa) sono della Bio-Rad: Fosforilasi b, 97.4 kDa; Albumina sierica 66.2; Ovalbumina, 45 kDa; Anidrasi carbonica, 31; Inibitore della tripsina, 21,5 kDa, Lisozima, 14,4.

L'idrossiapatite è un fosfato basico di calcio (3Ca3(PO4)2 Ca(OH)2) [11]. La presenza sulla resina di cariche positive e negative ne favorisce l'interazione con le proteine in funzione del tipo di cariche e della distribuzione delle stesse che è tipica di ogni proteina. L'idrossiapatite può essere preparata facilmente in laboratorio, ma quella utilizzata in questo lavoro è stata acquistata da un fornitore ed utilizzata come tale nella sua forma anidra (HTP). Si descrive di seguito come si ottiene la concentrazione, parziale purificazione ed immobilizzazione dell'enzima per adsorbimento "batch-wise" su idrossiapatite (HTP).

In un esperimento tipico, a 42 ml di sovranatante colturale sterile (42 U.E.), raccolto in un provettone Falcon graduato, viene aggiunto un grammo di idrossiapatite anidra e si lascia ad incubare a temperatura ambiente per 20'. La miscela viene quindi ripartita in due provettoni e posta a centrifugare 4°C a 10.000 rpm e per 10 min nel rotore JA-20 di una centrifuga Beckman J2-21.

Dopo la centrifugazione si elimina il sovranatante per aspirazione e si tratta uno dei due sedimenti con un ml di fosfato di sodio 0.4M pH 7.0 per 20 min, a temperatura ambiente, allo scopo di staccare l'enzima dalla resina ed averlo in

forma libera e concentrata. Si centrifuga a 13.000 rpm per 10 min. Le proteine presenti nel sovranatante (1ml) devono essere 120 mg. Il grado di purezza è circa tredici volte superiore rispetto a quello iniziale.

L'analisi elettroforetica in SDS su gel di poliacrilamide mostrata in Fig. 1 è stata effettuata su un campione di 20 mg concentrato mediante precipitazione con acetone freddo. I pesi molecolari apparenti delle tre bande sono di 114 kDa, 97 kDa e 80 kDa. Il "pattern" (campione) elettroforetico non si modifica a causa della bollitura del campione in SDS (sodio dodecil-solfato).

Il processo di parziale purificazione appena descritto è seguito in tutti gli "steps" mediante dosaggio enzimatico e dosaggio delle proteine effettuati secondo le metodiche descritte.

L'altro sedimento, ottenuto dopo la prima centrifugazione e non trattato con fosfato, rappresenta la forma immobilizzata dell'enzima ancora legato all'HTP. L'enzima immobilizzato è stato impiegato negli esperimenti di idrolisi dei glicosidi terpenici.

E' stato effettuato uno studio per valutare la capacità di idrolisi dei glicosidi terpenici ad opera dell'enzima da noi immobilizzato su HTP, comparandola a quella di un enzima pectolitico commerciale in soluzione. I due enzimi sono stati aggiunti, in quantità tali da avere attività comparabili, sia ad un vino Traminer (pH 3.1), che ai glicosidi estratti dallo stesso vino e risospesi in un tampone citrato fosfato (pH 5). Dai risultati ottenuti è emerso che l'enzima immobilizzato di *Deb. hansenii* libera più linalolo, a-terpineolo, alcool benzilico e 2-feniletilico, mentre l'enzima commerciale libera più citronellolo,

nerolo e geraniolo. Questo comportamento è riscontrabile sia nel vino che nel tampone. Nel caso del vino, tuttavia, la quantità totale di alcoli (monoterpenoli, alcool benzilico e 2-feniletilico) liberati dalle due preparazioni enzimatiche è minore rispetto alla prova in tampone, dimostrando che il pH è un fattore importante per l'attività enzimatica. Tuttavia la preparazione enzimatica di *Deb hansenii* sembra risentire meno del basso valore di pH del vino in quanto globalmente libera più alcoli. Per verificare la stabilità dell'enzima nel tempo sono stati effettuati dosaggi enzimatici su soluzioni dell'enzima ottenute da processi di parziale purificazione precedentemente condotti. Le soluzioni dell'enzima in citrato pH 6.8 e in fosfato pH 8 sono state conservate alla temperatura di 4 °C per 34 giorni. Dai risultati si osserva che l'enzima conserva la sua stabilità in entrambe le condizioni. Un'ulteriore indicazione riguardo la stabilità si è dedotta dosando l'attività dell'enzima parzialmente purificato e conservato in tampone acetato a pH 5 alla temperatura di -23°C. Dopo 70 giorni si osservava che l'enzima aveva perso solo l'11% della sua attività iniziale.

Il trovato riguarda dunque una frazione β-glucosidasica prodotta da un ceppo di *Deb. hansenii*, nella sua forma parzialmente purificata ed immobilizzata con una procedura "one-step" su una resina non tossica ed economica quale l'idrossiapatite. Questa β-glucosidasi sembra particolarmente interessante poiché, a differenza di altri enzimi con caratteristiche simili, non è inibita da alte concentrazioni di etanolo o di glucosio e non è influenzata da valori bassi di pH e temperatura.

Queste proprietà possono essere rilevanti in vista di una possibile applicazione di questa β-glucosidasi in biotecnologia per l'arricchimento dell'aroma nei vini.

La concentrazione e la purificazione dell'enzima sono indispensabili per il suo utilizzo. Fra i diversi procedimenti provati per ottenere rapidamente la concentrazione del filtrato, l'applicazione "batch-wise" della cromatografia per adsorbimento su idrossiapatite (HTP) si è rivelata estremamente interessante non solo per quanto riguarda il processo di concentrazione del filtrato, ma anche per la successiva purificazione dell'enzima. Infatti l'uso dell'HTP ha consentito di ottenere un enzima tredici volte più puro rispetto a quello iniziale. Dai risultati ottenuti si può concludere che vi sono degli aspetti vantaggiosi, per esempio:

- La β-glucosidasi del *Deb. hansenii* sembra essere una proteina acida, stabile alle basse temperature e stabile nel tempo. Il suo peso molecolare apparente è compreso tra gli 80 ed i 114 kDa.

- La frazione enzimatica parzialmente purificata ed immobilizzata su HTP, è attiva ed è in grado di catalizzare l'idrolisi dei glicosidi terpenici ancora meglio di un enzima pectolitico commerciale, in quanto risente meno del basso valore di pH del vino e globalmente libera più alcoli.

Inoltre, sono da considerare ancora i seguenti vantaggi:

1) la frazione β-glucosidasica prodotta, ha particolari proprietà di stabilità;

2) il processo di concentrazione e di parziale purificazione dell'enzima, è semplice, rapido ed economico;

3) l'enzima in forma immobilizzata può essere conservata e riutilizzata. Quest'ultimo aspetto fa comprendere che il prodotto enzimatico può essere facilmente separato dal substrato, ad esempio il vino, e quindi riutilizzato più volte. E' importante osservare che la resina utilizzata per la sequestrazione e

l'immobilizzazione dell'enzima, l'idrossiapatite, è una forma di fosfato di calcio assolutamente naturale. In quanto tale è una sostanza certamente non tossica, a differenza di altre resine polimeriche utilizzate in altri procedimenti di immobilizzazione di enzimi.

L'invenzione presenta anche vantaggi ecologici. La resina può essere preparata facilmente da chiunque a partire da soluzioni di calcio e fosfato e senza la necessità di particolari attrezzature, è rinnovabile e riutilizzabile, e non determina problemi di stoccaggio o di eliminazione.

L'idrossiapatite è uno dei normali mezzi utilizzabili per la purificazione di enzimi ed è stata utilizzata in altri laboratori per la purificazione "multi-steps" di enzimi. Però, secondo quanto risulta agli Inventori, essa non è mai stata utilizzata per la concentrazione e l'uso in forma immobilizzata di β-glucosidasi o di altri enzimi.

**Bibliografia**


[1] Z.Y. Gunata, S.M. Bitteur, J.M. Brillouet, C.L. Bayonove and R.E. Cordonnier, *Carbohydr. Res.* 184 (1988) 139.

[2] I. Rosi , M. Vinella I., P. Domizio, *Journal of Applied Bacteriology* 77 (1994) 519.

[3] P.J. Williams, C.R. Strauss, B. J. Wilson, *J. Agric. Food Chem.* 19, 1980, 28

[4] P.J. Williams, C.R. Strauss, B. J. Wilson, *Am. J. Enol. Vitic.* 32, 1981, 230

[5] C.L. Bayonove, Y.Z. Gunata and R.E. Cordonnier, *Bulletin de l' O.I.V.* 643 (1984)741.

[6] A.P. Aryan, B.Wilson, C.R.Strauss, and P.J. Williams, *Am. J. Enol. Vitic.* 38 (1987) 182.

[7] R.E. Cordonnier, Y.Z. Gunata, R.L Baumes and C.L. Bayonove, *Conn. Vigne Vin* 23 (1989) 7.

[8] S. K. Park, A. C. Noble in "*Beer and Wine Production*" Ed. B. H. Gump ACS Symposium Series 536, Washington DC 1993, p. 98.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento di immobilizzazione di una frazione enzimatica extracellulare per il trattamento di mosti, vini, altre bevande ottenute da frutta e per la produzioni di aromi naturali, caratterizzato dal fatto che, relativamente al microrganismo ed alle sue condizioni di crescita si procede nel modo seguente:

- si utilizza come ceppo di lievito il *Debaryomyces hansenii* 4025 DBVPG, precedentemente selezionato,

- essendo detto lievito fatto sviluppare in un terreno sintetico contenente Yeast Nitrogen Base (Difco) 0.67%, glucosio 0.5%, Tween 80 0.025%, tamponato a pH 5 con tampone tartrato fosfato 0.1 M;

- essendo detto terreno sterilizzato per filtrazione su filtri di acetato di cellulosa (Millipore, 0,22 mm);

- si lascia procedere la crescita in aerobiosi in beute riempite per un decimo del loro volume, poste in agitatore orbitale a 150 rpm, alla temperatura di 25°C per 20 h;

- si allestisce una precoltura facendo sviluppare le cellule per 24 h nel terreno in determinate condizioni d'incubazione;

- si prepara l'inoculo centrifugando la coltura a 10000 rpm a 4°C per 10 min.;

- si lavano le cellule residue per due volte con soluzione fisiologica sterile (NaCl 0.85 %);

- essendo sospese dette cellule in soluzione fisiologica sterile ed essendo la sospensione impiegata per l'inoculo in modo tale da avere una coltura con un valore di densità ottica iniziale, misurata a 600 nm, pari a 0,2.

2. Procedimento di immobilizzazione di una frazione enzimatica extracellulare per il trattamento di mosti, vini, altre bevande ottenute da frutta e per la produzioni di aromi naturali, secondo la Riv. 1 , caratterizzato dal fatto che, per il recupero del filtrato cellulare, si procede nel modo seguente:

dopo lo sviluppo il brodo colturale viene filtrato attraverso un filtro in acetato di cellulosa (Millipore 0.45 m diametro dei pori), essendo, quindi il filtrato utilizzato come fonte extracellulare di enzima.

3. Procedimento di immobilizzazione di una frazione enzimatica extracellulare per il trattamento di mosti, vini, altre bevande ottenute da frutta e per la produzioni di aromi naturali, secondo la Riv.1, caratterizzato dal fatto che per il dosaggio dell'attività enzimatica extracellulare si procede nel modo seguente:

l'attività β-glucosidasica presente nel surnatante colturale viene dosata usando come substrato il p-nitrofenil-β-d-glucopiranoside (pNPG) e misurando il p-nitrofenolo liberato.

4. Procedimento di immobilizzazione di una frazione enzimatica extracellulare per il trattamento di mosti, vini, altre bevande ottenute da frutta e per la produzioni di aromi naturali, secondo le Rivv. da 1 a 3, caratterizzato dal fatto che il dosaggio delle proteine viene effettuato con il reattivo di Bradford ed il metodo BIO-RAD utilizzando l'albumina da siero bovino (BSA) come standard e la concentrazione del BSA viene determinata spettrofotometricamente a 279nm sfruttando il coefficiente di estinzione $e^{1\%} = 6.56$ a 279 nm.

5. Procedimento di immobilizzazione di una frazione enzimatica extracellulare per il trattamento di mosti, vini, altre bevande ottenute da frutta e per la produzioni di aromi naturali, secondo la Riv. 1, caratterizzato dal fatto che

l'analisi elettroforetica viene effettuata su gel di poliacrilamide in sodio dodecil-solfato (SDS-PAGE) utilizzando gels di 1.5 mm al 6% di acrilamide; essendo i campioni concentrati per ultrafiltrazione, liofilizzazione, o mediante precipitazione con acetone freddo prima della solubilizzazione con l'SDS; quindi effettuando l'incubazione a temperatura ambiente; essendo la corsa effettuata per un tempo inferiore alle tre ore su mini apparecchiature (come per es. Hoefer o Bio-Rad) termostatando a 4°C; e considerando che le proteine standard (range 14,4-97,4 kDa) possono essere per es. quelle della Bio-Rad: per es.:

- Fosforilasi b, 97.4 kDa,
-Albumina sierica 66.2,
-Ovalbumina, 45 kDa,
-Anidrasi carbonica, 31,
- Inibitore della tripsina, 21,5 kDa, Lisozima, 14,4.

6. Procedimento di immobilizzazione di una frazione enzimatica extracellulare per il trattamento di mosti, vini, altre bevande ottenute da frutta e per la produzioni di aromi naturali, caratterizzato dal fatto che l' idrossiapatite HTP può essere preparata facilmente in laboratorio, o può essere acquistata a piacere da un qualsiasi fornitore specifico.

7. Procedimento di immobilizzazione di una frazione enzimatica extracellulare per il trattamento di mosti, vini, altre bevande ottenute da frutta e per la produzioni di aromi naturali, secondo le Rivv. 1 e 6, caratterizzato dal fatto che per ottenere la concentrazione parziale e l'immobilizzazione dell'enzima per adsorbimento "batch wise" su idrissiapatite (HTP) si procede come segue:

-si aggiunge un grammo di idrossiapatite anidra a 42 ml di sovranatante colturale sterile (42 U.E.) raccolto in un provettone Falcon graduato,

-si lascia incubare a temperatura ambiente per 20 min.

-si ripartisce la miscela in due provettoni,

-si pone un provettone in centrifuga a 4°C a 10.000 rpm e per 10 min;

- si elimina il sovranatante per aspirazione;

- si tratta uno dei due sedimenti con un ml di fosfato di sodio 0.4M pH 7.0 per 20 min a temperatura ambiente;

- si stacca l'enzima dalla resina ottenendolo in forma libera e concentrata;

-si centrifuga l'enzima a 13.000 rpm per 10 min.

**8.** Procedimento di immobilizzazione di una frazione enzimatica extracellulare per il trattamento di mosti, vini, altre bevande ottenute da frutta e per la produzioni di aromi naturali, secondo la Riv.7, caratterizzato dal fatto che il processo di parziale purificazione e concentrazione può essere seguito mediante dosaggio enzimatico e dosaggio delle proteine effettuati secondo determinate metodiche.

**9.** Procedimento di immobilizzazione di una frazione enzimatica extracellulare per il trattamento di mosti, vini, altre bevande ottenute da frutta e per la produzioni di aromi naturali, secondo la Riv. 6 e 7, caratterizzato dal fatto che l'altro sedimento, ottenuto prima della centrifugazione e non trattato con fosfato, rappresenta la forma concentrata dell'enzima ancora legato all'HTP.

**10.** Procedimento di immobilizzazione di una frazione enzimatica extracellulare per il trattamento di mosti, vini, altre bevande ottenute da frutta e per la produzioni di aromi naturali, secondo le Riv.da 1 a 9, caratterizzato dal fatto che

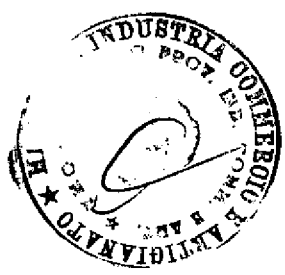
l'enzima immobilizzato per liberare i monoterpeni dai complessi glicosidici, inodori, presenti nei mosti o nei vini o in altri tipi di frutta o per produrre aromi "naturali" da aggiungere agli alimenti, può essere ripetutamente utilizzato e quindi idoneo ad essere industrializzato.

********

Roma, 21 APR. 1995

p.i. CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

DR. L. PERROTTA (102 D)



RM95 A 000256

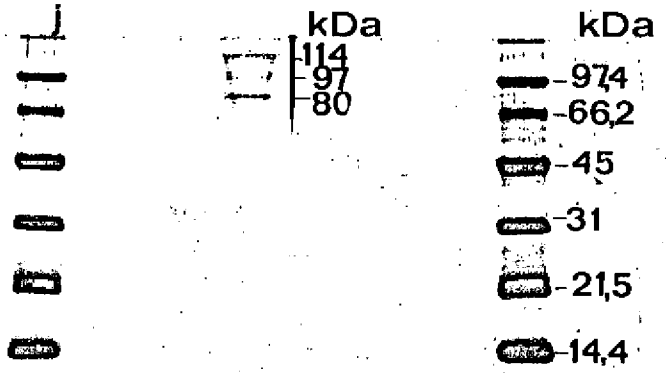



FIG.1

p.i. CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

DR. L. PERROTTA (102 D)