

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

**Enzimi alimentari: ruolo e meccanismo d'azione
nella produzione di formaggio, vino e lievitati**

Relatore:

Prof. Saverio Santi

Laureanda:

Annalia Agostini

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

1. INTRODUZIONE	1
2. PROCESSI DI PRODUZIONE	5
2.1 Formaggio	5
2.2 Vino	5
2.3 Prodotti lievitati	6
3. GLI ENZIMI.....	7
3.1 Amilasi.....	7
3.2 Glucosio ossidasi	9
3.3 Proteasi.....	10
3.4 Pectinasi	11
4. ENZIMI ENDOGENI ED ESOGENI	15
5. PROSPETTIVE FUTURE	19
6. CONCLUSIONI.....	21
BIBLIOGRAFIA	22

1. INTRODUZIONE

Gli enzimi sono biomolecole in grado di catalizzare le reazioni chimiche senza risultarne essi stessi trasformati. La catalisi avviene con l'abbassamento della barriera di attivazione, cioè della differenza di energia (ΔG^\ddagger) tra i reagenti (A, B) e lo stato di transizione (X^\ddagger), mentre non viene modificata l'energia degli stati iniziale e finale (Figura 1). Poiché l'abbassamento della barriera cinetica favorisce tanto la reazione diretta quanto quella inversa, la posizione dell'equilibrio non viene alterata dalla presenza di un enzima. Rispetto ad altri catalizzatori, gli enzimi hanno la caratteristica di essere molto specifici verso il substrato su cui devono agire. (1)

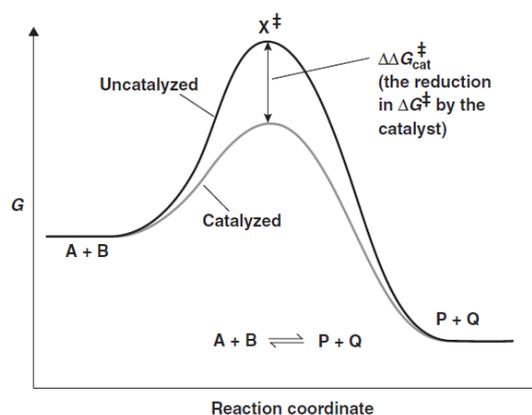


Figura 1. Grafico dell'energia libera in una reazione catalizzata e non.

Quasi tutti gli enzimi hanno natura proteica. Tuttavia si possono distinguere gli enzimi semplici, costituiti solo da amminoacidi e quindi interamente proteici, dagli enzimi coniugati, in cui la parte proteica (apoenzima) non funziona se non accoppiata ad una parte non proteica, detta cofattore. (2)

Per funzionare come catalizzatori, gli enzimi devono avere una ben definita struttura tridimensionale. (3) Gli enzimi, come tutte le proteine, sono principalmente costituiti dai 20 amminoacidi naturali, legati tra loro attraverso legami peptidici tra il gruppo amminico di un monomero e il gruppo carbossilico di quello successivo. La struttura primaria dell'enzima è data dalla sequenza ordinata di amminoacidi, che ne determina l'attività biologica (enzimi che agiscono in modo simile di solito hanno struttura primaria simile). Le catene così formate possono ripiegarsi su se stesse perché alcuni legami possono ruotare (la rotazione è possibile intorno

all'asse di legame N—C α e C α —C') (*Figura 2*): si forma così la struttura secondaria della proteina. Si possono generare diverse strutture, come l' α -elica e il foglietto- β (β -sheet).

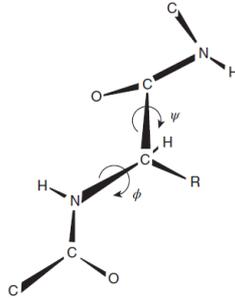


Figura 2. Rotazione dei legami in un polipeptide.

Inoltre, le proteine si riarrangiano in una struttura terziaria, che consiste nel ripiegamento tridimensionale delle catene. La driving force di questo ripiegamento risiede nella tendenza ad esporre al solvente polare come l'acqua i gruppi idrofilici, e tenere all'interno quelli idrofobici. Inoltre, in questo modo, si vengono a trovare vicini gruppi che, nella catena peptidica, sono anche molto lontani. In *Figura 3* si trovano schematizzati i diversi livelli della strutturazione delle proteine.

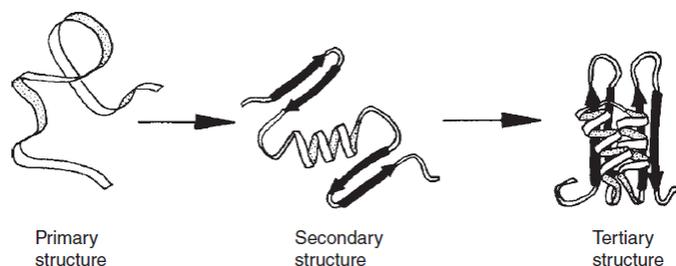


Figura 3. Rappresentazione della struttura primaria, secondaria e terziaria di una proteina.

L'informazione richiesta per formare la struttura secondaria e terziaria di una proteina è codificata nella sequenza amminoacidica, ed è per questo che le proteine denaturate sono spesso in grado di ripiegarsi spontaneamente anche in vitro. Una proteina con struttura terziaria è di per sé funzionale e, nel caso degli enzimi, a questo livello sono presenti tasche o cavità, dette siti attivi. Un enzima è infatti una molecola molto grande rispetto alle molecole del substrato (cioè i reagenti della reazione biocatalizzata), ma nei siti attivi può alloggiare una piccola molecola, che si lega all'enzima per dare inizio alla reazione enzimatica. Tuttavia, non sempre una proteina formata da un'unica catena ripiegata su se stessa ha

una sua funzione: talvolta è necessaria l'associazione di due o più polipeptidi ripiegati, che prendono il nome di subunità, per formare una molecola funzionale. Si ha in questo caso la struttura quaternaria delle proteine, che è definita dalla disposizione relativa delle varie subunità. Le forze che tengono insieme due subunità sono le stesse forze non covalenti responsabili della struttura terziaria (legami idrogeno, ponti salini, interazioni idrofobiche, ponti disolfuro,...).

Come accennato sopra, in una reazione enzimatica il reagente prende il nome di substrato. La biocatalisi di una reazione chimica inizia con la formazione di un legame (dato da molte interazioni deboli) tra l'enzima e il substrato, in corrispondenza del sito attivo dell'enzima. Il legame che si forma porta ad un rilascio di energia libera, che viene utilizzata per abbassare la barriera di attivazione della reazione. Sono due i principali modelli che descrivono la formazione del complesso enzima-substrato: il modello chiave-serratura e il fit indotto. Il modello chiave-serratura prevede un legame molto compatto tra enzima e substrato, probabilmente dovuto a una buona complementarità tra la forma del substrato e la geometria del sito attivo dell'enzima. Nel modello di fit indotto, invece, l'enzima non è di per sé perfettamente compatibile con il substrato, ma la sua forma tridimensionale è abbastanza flessibile, così viene indotta la complementarità nel momento in cui le due unità si legano. (2)

Per quanto riguarda l'applicazione all'industria alimentare, l'utilizzo di enzimi è spesso fondamentale per trasformare le materie prime nel prodotto finito, ma anche per migliorare le qualità dell'alimento (sapore, texture, lavorabilità ecc.). L'interesse verso gli enzimi in questo ambito è molto forte perché la richiesta di prodotti con certe caratteristiche è in costante crescita, a causa anche dell'aumento della popolazione mondiale. Gli enzimi vengono prodotti da animali, piante e microorganismi: questi ultimi sono i più utilizzati e sono preferibili grazie alla loro buona disponibilità e alta velocità di crescita. La loro efficienza (che riduce i tempi di lavorazione), il basso costo e la sostenibilità ambientale sono altri fattori che rendono ideali questo tipo di enzimi. Tali microorganismi vengono utilizzati nella produzione alimentare fin dall'antichità, ma ora c'è la consapevolezza del loro effettivo ruolo, quindi i processi sono stati ottimizzati ed è aumentata la sicurezza e la qualità dei prodotti. Gli enzimi nell'industria alimentare vengono usati come additivi, ma essendo naturali, puliti e ecosostenibili sono preferibili rispetto ai metodi tradizionali (catalizzatori e additivi chimici), di cui costituiscono una valida alternativa, rispondendo anche alla necessità di tecnologie più verdi. (4)

Tutti gli enzimi utilizzati nella produzione alimentare nell'Unione Europea devono essere valutati dall'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) e approvati dalla Commissione Europea. Secondo il Regolamento UE relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, (5) gli enzimi alimentari, come gli additivi, sono considerati ingredienti. Tuttavia, nei casi in cui gli enzimi sono presenti in quanto contenuti negli ingredienti ma non svolgono una funzione tecnologica, oppure quando vengono usati come "coadiuvanti tecnologici", non è richiesta la loro menzione in etichetta. In ogni caso, tali enzimi non devono provocare intolleranze o allergie nei consumatori.

2. PROCESSI DI PRODUZIONE

2.1 Formaggio

Il formaggio si prepara utilizzando solamente latte, caglio e sale. Il latte contiene un'importante quantità di proteine (3,2%), per la maggior parte caseine, responsabili della coagulazione nella produzione del formaggio. Ci sono vari tipi di caseine (α , β , κ). Queste proteine non coagulano con il calore, quindi non subiscono perdite significative nella pastorizzazione del latte, ma coagulano per azione del pH o di alcuni enzimi contenuti nel caglio (chimosina e rennina). Dalla coagulazione si ottiene la cagliata, un gel morbido e fragile. (6) Segue poi la rottura della cagliata per far spurgare il siero, la cottura (solo per alcuni formaggi), l'estrazione della cagliata dal siero, la messa in forma (utilizzando stampi o fascere, poi una pressa per spurgare ulteriore siero e per dare compattezza al formaggio), la salagione e la maturazione. Gli enzimi tipicamente utilizzati nella produzione del formaggio sono le peptidasi (come la chimosina), fosfolipasi e lipasi. Questi enzimi hanno il compito di: coagulare il latte idrolizzando la caseina; modificare la viscosità e la texture, la solubilità e la stabilità; aumentare la produzione di sapore durante la maturazione. (7)

2.2 Vino

La produzione del vino inizia con la vendemmia. Quando l'uva arriva in cantina, dopo il controllo zuccherino per valutare il grado alcolico che avrà il vino, avviene la pigiatura (con diversi tipi di presse), per estrarre il succo d'uva dagli acini, e la fermentazione, durante la quale lo zucchero si trasforma in alcol e quindi si passa dal mosto al vino. (6) Nella produzione del vino si usano enzimi per: migliorare la macerazione, estrazione e processatura dell'uva; migliorare l'estrazione di aroma e colore, aumentando così la qualità del vino; ridurre i tempi di pressatura; favorire la filtrabilità del vino; aiutare l'invecchiamento del vino sulla feccia; evitare che il vino venga rovinato da batteri lattici; aumentare la resa del prodotto riducendo rapidamente la viscosità. Gli enzimi tipicamente usati in questi processi sono enzimi pectinolitici, glucanasi, cellulasi e emicellulasi, β -glucosidasi e altre glicosidasi e lisozima. (7)

2.3 Prodotti lievitati

Per quanto riguarda i lievitati, la loro produzione prevede di mescolare la farina con acqua, sale, zucchero e lievito di birra, più eventualmente altri ingredienti in base al prodotto finale desiderato. Si può intervenire sulla farina con processi ossidativi o riduttivi, che modulano la morbidezza e la forza della farina, e quindi la velocità del processo di lievitazione. Segue poi l'impastamento, durante il quale inizia a formarsi il glutine, si favorisce l'attività dell'amilasi, viene incorporata aria e inizia la fermentazione da parte dei lieviti. Durante la lievitazione viene prodotta CO₂ per azione del lievito. Il glutine forma una maglia e, maggiore è la capacità del reticolo del glutine di trattenere gas, maggiore sarà il volume che può raggiungere l'impasto. Infine si ha la cottura, durante la quale avvengono diversi fenomeni come la morte dei lieviti, l'intensificazione iniziale dell'attività enzimatica (prima della denaturazione degli enzimi stessi), la gelificazione dell'amido, la formazione della crosta e la reazione di Maillard che porta allo sviluppo di colore e aroma. (6)

Gli enzimi alimentari in questo caso vengono addizionati agli ingredienti che vengono mescolati, e agiscono sui diversi substrati presenti, come carboidrati (tra cui l'amido), lipidi, proteine ecc. I loro ruoli sono: facilitare la manipolazione dell'impasto; migliorare la sua struttura e il suo comportamento durante la cottura; assicurare la lavorabilità e migliorare il processo di produzione; migliorare le caratteristiche finali (volume, morbidezza della crosta, aumento della shelf life). Gli enzimi tipicamente utilizzati per questi scopi sono amilasi, emicellulasi, lipasi, glucosio ossidasi, cellulasi, peptidasi e transglutaminasi. (7)

3. GLI ENZIMI

La maggior parte degli enzimi utilizzati nei processi di produzione alimentare sopra descritti appartengono alla classe delle idrolasi: il loro compito è quello di catalizzare la rottura (attraverso l'idrolisi appunto) di alcuni specifici legami del substrato per permettere o facilitare le reazioni successive. Ci sono però anche enzimi della classe delle ossidoriduttasi (catalizzano reazioni redox) e delle transferasi (catalizzano il trasferimento di un gruppo da un substrato ad un altro). Questa discussione approfondirà solo alcuni degli enzimi citati, quelli più determinanti nella produzione di lievitati, vino e formaggio. In particolare: amilasi e glucosio ossidasi per i prodotti lievitati; proteasi per il formaggio; pectinasi per il vino.

3.1 Amilasi

Tra gli enzimi più importanti dell'intera industria alimentare ci sono le amilasi, che idrolizzano i legami dell'amido e sono dunque delle glicosidasi. Per capire come agisce l'amilasi bisogna sapere come è fatto l'amido. L'amido è un polimero del glucosio che rappresenta la maggiore riserva energetica delle piante. Si presenta sottoforma di granuli insolubili in acqua a temperatura ambiente, costituiti da amilosio e amilopectina. Il primo è formato da catene lineari di glucosio in cui ogni monomero è legato al successivo con un legame α -1,4-glicosidico, mentre la seconda presenta anche delle ramificazioni date da legami α -1,6-glicosidici che si formano tra alcune unità di glucosio. Ogni catena, sia di amilosio che di amilopectina, possiede un'estremità riducente. È importante il fatto che nell'amilosio i legami glicosidici sono in configurazione α , perché ciò determina la differenza tra l'amido e la cellulosa: le catene di quest'ultima, avendo legami β -1,4-glicosidici, hanno una struttura a nastro piatto, mentre le catene di amilosio formano un'elica. Questo ha un effetto importante sulle proprietà chimico-fisiche e sulla suscettibilità all'azione degli enzimi. (8)

Tra i vari tipi esistenti di amilasi, che tagliano le catene di amido selettivamente in diversi punti, i più importanti sono l' α -amilasi e la β -amilasi. Entrambe catalizzano l'idrolisi di un legame α -1,4-glicosidico (non sono in grado di rompere i legami α -1,6 dell'amilopectina) in una catena costituita da almeno 3 unità di glucosio. Tuttavia, i due enzimi agiscono in posizioni diverse: l' α -amilasi produce maltosio, maltotriosio e oligosaccaridi con configurazione α , agendo casualmente su legami α -1,4-glicosidici di amido gelatinizzato e danneggiato, mentre la β -

amilasi stacca disaccaridi partendo dall'estremità non riducente della catena (produce β -maltosio). Come conseguenza, la viscosità delle soluzioni trattate con α -amilasi diminuisce rapidamente, vista la randomicità dell'azione di questo enzima, mentre quella delle soluzioni trattate con β -amilasi diminuisce più gradualmente nel corso dell'azione dell'enzima. Un'altra differenza tra α - e β -amilasi sta nella loro disponibilità: l' α -amilasi è ampiamente distribuita in natura, mentre la β -amilasi si trova solo nelle piante. La farina contiene normalmente un'adeguata quantità di β -amilasi e basse quantità di α -amilasi. Quest'ultima deve quindi essere integrata per avere nell'impasto una quantità di zuccheri sufficiente per la fermentazione, e viene comunemente aggiunta nella produzione del pane. (2,8)

Esistono anche altri tipi di amilasi rilevanti nella panificazione (*Figura 4*), che idrolizzano le catene in punti diversi. Infatti, oltre all' α -amilasi, che idrolizza i legami α -1,4-glicosidici bypassando quelli α -1,6-glicosidici, e alla β -amilasi, che idrolizza i legami α -1,4-glicosidici ma non è in grado di bypassare i legami α -1,6-glicosidici, ci sono: enzimi che riescono ad idrolizzare entrambi i tipi di legame, come la glucoamilasi; enzimi che idrolizzano solo i legami α -1,6, come la pullulanasi; enzimi come l' α -glucosidasi, che rompono preferenzialmente i legami α -1,4 di oligosaccaridi prodotti da altri enzimi. (9)

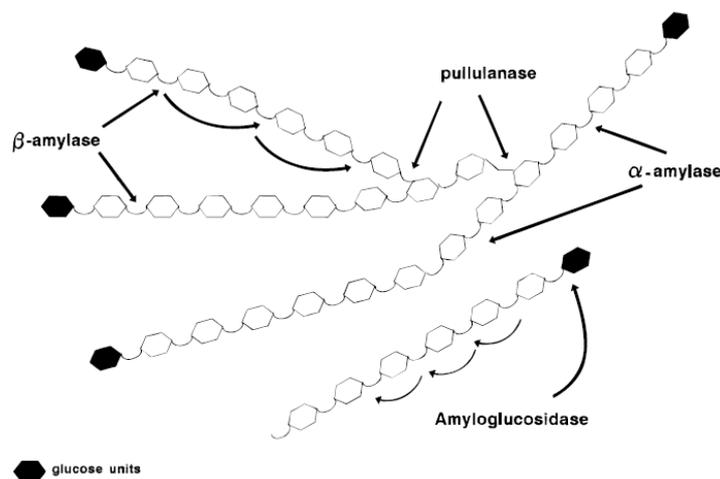


Figura 4. Tipi di amilasi e loro sito di azione.

Le amilasi si possono dividere in due macrocategorie: endo- ed esoamilasi. Le endoamilasi rompono la catena in punti random lontano dalle estremità e quindi si ottengono catene di varia lunghezza, che possono essere ramificate o lineari, mentre le esoamilasi partono dall'estremità riducente e catalizzano l'idrolisi di legami in punti specifici, portando a prodotti dal basso peso molecolare, tutti uguali.

L'α-amilasi è un esempio di endoamilasi; la β-amilasi appartiene invece alle esoa-amilasi. (10)

Indipendentemente dalla loro specifica azione, le amilasi sono importanti nella panificazione perché portano alla produzione di zuccheri fermentescibili, che vengono poi utilizzati dal lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) come fonte di carbonio per la fermentazione (2). Anche la diminuzione della viscosità è un effetto importante dell'azione dell'amilasi (soprattutto dell'α-amilasi): in assenza di questo enzima, la gelificazione dell'amido intatto, che inizia a 55°C, causa la fuoriuscita dell'amilosio dai granuli e l'inizio della fusione dei cristalli di amilopectina. Questi fenomeni aumentano notevolmente la viscosità dell'impasto e bloccano la sua crescita in forno. L'amilasi attacca l'amido gelificato riducendone la viscosità, così si prolunga il tempo della crescita in forno e il volume del pane risulta maggiore. (11)

3.2 Glucosio ossidasi

La glucosio ossidasi (GOD) è un enzima appartenente alla classe delle ossidoriduttasi (catalizza reazioni redox) e funziona in presenza di ossigeno, che agisce da ossidante in quanto accettore di elettroni, mentre il glucosio è il substrato che viene ossidato. La GOD è un omodimero, cioè un enzima coniugato formato da due subunità identiche, a cui sono legati in modo non covalente due molecole di FAD (flavina adenina dinucleotide). Il FAD è un coenzima che agisce da portatore di elettroni durante la catalisi. (12)

Andando ad esaminare più nel dettaglio la reazione (*Figura 5*), si possono individuare uno stadio riduttivo e uno ossidativo. Nella fase riduttiva la GOD catalizza l'ossidazione del β-D-glucosio a D-glucono-δ-lattone, che poi viene idrolizzato per via non enzimatica ad acido glucuronico. Successivamente l'anello di FAD

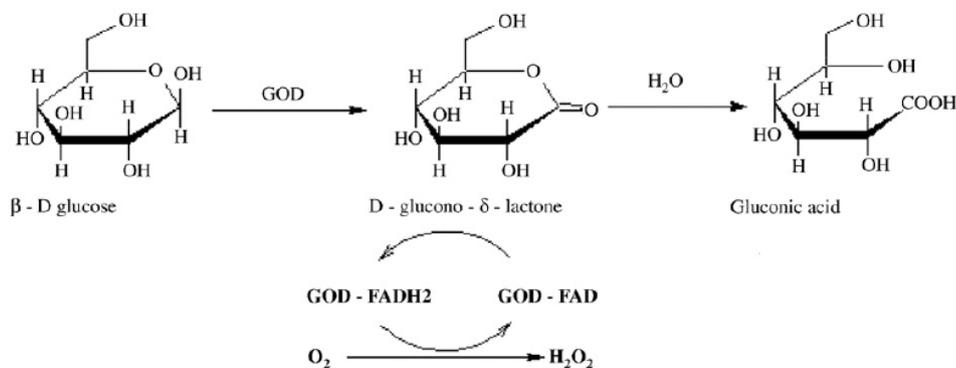


Figura 5. Schema della reazione catalizzata dall'enzima glucosio ossidasi.

contenuto nella GOD viene ridotto a FADH_2 . Nello step ossidativo, la GOD ridotta viene nuovamente ossidata dall'ossigeno per ottenere H_2O_2 . L' H_2O_2 viene poi scissa da un altro enzima (catalasi) per ottenere acqua e ossigeno. (13)

Poiché produce perossido di idrogeno, la GOD viene spesso utilizzata come antimicrobico o antifungino, ma si usa anche nella produzione del pane per migliorare la texture dell'impasto, rappresentando un'alternativa ecologica e sicura all'utilizzo di ossidanti chimici come l'acido ascorbico e il bromato di potassio (quest'ultimo potenzialmente cancerogeno). La farina contiene due proteine fondamentali, glutenine e gliadine, che formano il glutine quando entrano in contatto con acqua. Se queste due proteine vengono ossidate aumentano i legami che si formano nello sviluppo del glutine e il reticolo si rafforza.

Le reazioni di ossidoriduzione che avvengono durante la panificazione sono complicate e spesso poco comprese, ma sono state fatte delle ipotesi:

- a. l'ossidazione del glucosio porta alla produzione di perossido di idrogeno, che in presenza della perossidasi (naturalmente presente nella farina) promuove l'ossidazione dei gruppi solfidrilici dei residui di cisteina in ponti disolfuro;
- b. nella farina è presente il glutatione (GSH) che indebolisce la struttura del glutine perché tende ad ossidarsi riducendo i ponti disolfuro a gruppi solfidrilici. Il perossido di idrogeno prodotto dall'ossidazione del glucosio riduce la quantità di glutatione ridotto.

In entrambi i casi il risultato è l'aumento dei ponti disolfuro, cioè l'ossidazione delle glutenine e delle gliadine, grazie al perossido di idrogeno. Di conseguenza la struttura del glutine si rafforza, l'impasto risulta più elastico e viscoso e le sue proprietà migliorano: il reticolo del glutine è in grado di trattenerne più gas e il volume che può raggiungere l'impasto durante la lievitazione è maggiore. (11,12)

3.3 Proteasi

Le proteasi, o peptidasi, sono un gruppo di enzimi appartenenti alla classe delle idrolasi, che rompono il legame peptidico tra gli amminoacidi delle proteine. Sono indispensabili alla vita di ogni organismo e perciò vengono naturalmente prodotti da animali e piante, oltre che da microorganismi. Tradizionalmente vengono utilizzate le proteasi prodotte da animali e piante per l'utilizzo nell'industria alimentare (ad esempio nella produzione di formaggi), mentre più recentemente, per ragioni ambientali ed etiche, si preferisce utilizzare proteasi da fonti microbiche.

Le proteasi si dividono in due grandi gruppi in base al loro sito d'azione: le esoproteasi e le endoproteasi. Le prime agiscono solo in prossimità di un'estremità della catena peptidica (estremità amminica o carbossilica), mentre le seconde agiscono preferenzialmente lontano da tali estremità, nelle regioni interne del polipeptide.

Un utilizzo importante si ha nella produzione di formaggio, per la coagulazione del latte. Le proteine contenute nel latte bovino si dividono in caseine e sieroproteine. Le caseine costituiscono l'80% del totale delle proteine e si distinguono in α -, β - e κ -caseina. Di queste, la κ -caseina è l'unica solubile e normalmente interagisce con le altre formando aggregati colloidali ed evitando la loro precipitazione. Il processo della coagulazione è composto da due stadi: il primo è lo stadio proteolitico e prevede la produzione enzimatica, da parte della chimosina, della para-caseina (insolubile), attraverso la rottura di uno specifico legame peptidico della κ -caseina (il legame tra Phe 105 e Met 106); il secondo stadio è la coagulazione vera e propria e consiste nella precipitazione o gelificazione della para-caseina da parte del Ca^{2+} . Quando sono presenti ioni calcio, infatti, le caseine che interagiscono con esso, insieme alla para- κ -caseina, formano un coagulo. Lo stadio proteolitico si conclude essenzialmente prima che avvenga la coagulazione. (14)

La chimosina è l'enzima preferito in quanto molto specifico per la κ -caseina: utilizzando enzimi non specifici si avrebbe l'idrolisi anche della α - e β -caseina, l'azoto contenuto in esse verrebbe perso nel siero e la resa nella produzione del formaggio sarebbe minore. L'ingrediente che si utilizza è il caglio, che oltre alla chimosina contiene anche rennina. Attualmente la fonte più importante di caglio è l'abomaso, cioè il quarto stomaco, dei vitelli non ancora svezzati, perché contiene un maggior rapporto chimosina/rennina (80-90% di chimosina) rispetto ad altri coagulanti. La grande richiesta degli ultimi tempi sta portando però verso la ricerca di fonti microbiche per questi enzimi. (15,16)

3.4 Pectinasi

Le pectinasi sono una classe di enzimi che catalizzano la rottura (idrolisi) dei legami della pectina. La pectina è un polisaccaride, o meglio un insieme di polisaccaridi, presente nelle pareti cellulari dei vegetali (ha un ruolo strutturale) ed è una macromolecola molto complessa, che sotto le opportune condizioni è in

grado di gelificare. Le sue proprietà chimico-fisiche sono influenzate dal fatto che la pectina è polimolecolare (eterogenea chimicamente) e anche polidispersa (eterogenea per quanto riguarda i pesi molecolari).

La pectina è principalmente un polimero dell'acido D-galatturonico, quindi è un polianione (policarbossilato), in cui alcuni alcuni gruppi carbossilici possono essere esterificati. I carbossilati sono in parte o del tutto neutralizzati da cationi (sodio, potassio, ammonio). Il grado di esterificazione e la presenza di controioni, insieme al peso molecolare, la concentrazione e il pH, determinano la solubilità della pectina e la viscosità delle sue soluzioni. Le soluzioni di pectina hanno il comportamento non-newtoniano e pseudoplastico caratteristico di molti polisaccaridi. (17)

In base allo scheletro della catena, le sostanze pectiche si possono dividere in:

- protopectina, un precursore che dà pectina o acido pectinico in seguito ad idrolisi;
- acidi pectici, acidi galatturonici che contengono una quantità trascurabile di gruppi metossidici; i suoi sali si chiamano pectati;
- acidi pectinici, galatturoni con varie quantità di gruppi metossilici; hanno la proprietà unica di formare gel con zuccheri e acidi;
- pectine, termine generico per indicare una miscela di sostanze con composizione molto diversa, con acido pectinico come maggior componente; nella sua forma nativa si trova nella parete cellulare e può essere intervalata ad altri polisaccaridi strutturali e proteine per formare la protopectina. (18)

Una sostanza pectica contiene tre componenti principali: (19)

- omogalatturonano, catena non ramificata di residui di acido galatturonosilico legati con legami α -1,4, in parte esterificati al C6 con metanolo;
- ramnogalatturonano I, con catena principale in cui si alternano ramnosio e acido galatturonico e catene laterali di arabinani e arabinogalattani;
- ramnogalatturonano II, con una struttura molto complessa che non può essere idrolizzata da enzimi.

La presenza della pectina nella frutta rappresenta una problematica nella produzione del vino: la pectina ha le proprietà di formare gel e di trattenere acqua, e questo ostacola la diffusione dei composti fenolici e degli aromi nel mosto durante la pre-fermentazione e la fermentazione. L'alta viscosità delle soluzioni di pectina, inoltre, impedisce l'estrazione del succo dall'uva, rende difficoltosa la filtrazione del vino e ne aumenta la torbidità. Per evitare questi inconvenienti si utilizzano le

pectinasi, enzimi che catalizzano la degradazione delle sostanze pectiche attraverso la deesterificazione o la depolimerizzazione. La famiglia delle pectinasi include:

- pectina liasi (PL), che catalizza reazioni di β -eliminazione per tagliare le catene di pectina tra due unità di acido galatturonico metilato, riducendo così il grado di polimerizzazione;
- poligalatturonasi (PG), che depolimerizza la pectina attraverso l'idrolisi dei legami glicosidici, preferendo un substrato non metilato;
- pectina metil-esterasi (PME), che non depolimerizza ma deesterifica, cioè idrolizza i legami esterei liberando molecole di metanolo dagli acidi galatturonici esterificati; la PME facilita l'azione della PG. (19)

La *Figura 6* (20) schematizza la struttura della pectina e riassume l'attività delle diverse pectinasi.

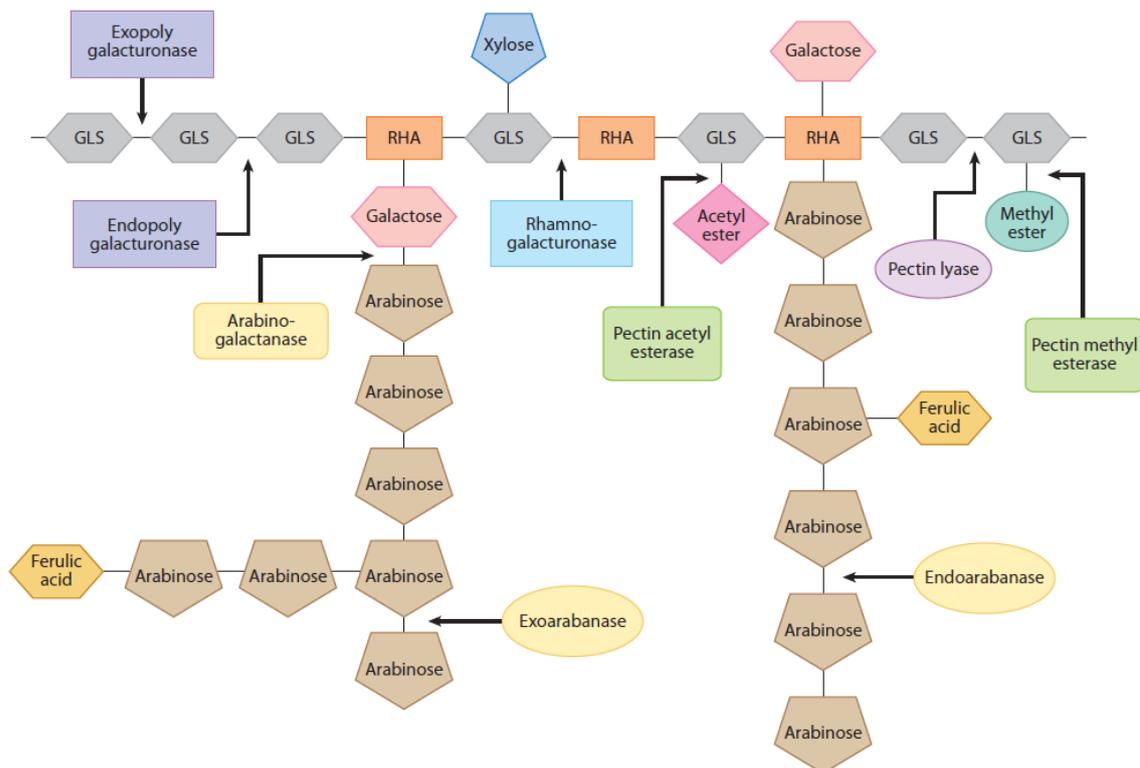


Figura 6. Attività delle pectinasi su un substrato pectinico. GLS sta per Acido galatturonico, mentre RHA indica il ramnosio

L'effetto di questi enzimi, che possono essere aggiunti in vari stadi della produzione del vino, è la trasformazione delle pectine in molecole più piccole, e i vantaggi conseguenti sono diversi. Il momento migliore per aggiungere le pectinasi è all'inizio, durante la pressatura dell'uva: le pareti cellulari vengono degradate e

il succo, staccandosi più facilmente dalla polpa, si libera in maggiore quantità. Inoltre viene favorito il rilascio di antocianine dal frutto al succo. Se le pectinasi vengono aggiunte durante la fermentazione alcolica o prima di essa, aumenta la velocità di flocculazione del mosto e vengono rimossi microrganismi dannosi e la materia in sospensione. La riduzione dell'effetto colloidale e della viscosità portano ad una chiarificazione del succo ottenuto. Infine, aggiungendo le pectinasi quando il vino è pronto per l'imbottigliamento, si facilita la filtrazione perché le molecole più piccole non vanno ad ostruire il filtro. In quest'ultimo caso bisogna considerare che l'alcol ha un effetto inibitorio sugli enzimi e si deve regolare di conseguenza la quantità di pectinasi utilizzata. (18,21)

Un aspetto negativo dell'utilizzo delle pectinasi, e in particolare della pectinesterasi, è l'aumento nel vino della quantità di metanolo, che è un prodotto indesiderato in quanto tossico per l'uomo e la sua concentrazione massima nel vino è regolamentata. La quantità di pectinasi utilizzata nelle formulazioni commerciali deve quindi essere bassa, e si rendono necessari ulteriori step di purificazione, che aumentano i costi della produzione. Per questo motivo si stanno cercando degli enzimi diversi da quelli tradizionalmente usati per degradare la pectina, in modo da rendere il processo più efficiente e il prodotto più sicuro. (22)

4. ENZIMI ENDOGENI ED ESOGENI

La natura produce una grande quantità di enzimi, che svolgono attività catalitiche nelle reazioni biochimiche che normalmente avvengono negli organismi viventi. Nel loro ambiente originale questi enzimi sono “endogeni”, ma nel momento in cui vengono rimossi dal loro habitat naturale sono definiti “esogeni” e continuano a catalizzare le stesse reazioni, se hanno accesso ai giusti substrati. (23) Entrambi i tipi di enzimi (endogeni ed esogeni) hanno un ruolo nella produzione di molti alimenti. Gli enzimi esogeni, usati come additivi alimentari da molti anni, vengono selezionati ad hoc ed aggiunti nella formulazione per indurre specifici cambiamenti. In questo caso, è fondamentale una conoscenza precisa dell'enzima e dei fattori che ne influenzano l'attività, per ottimizzare l'efficacia e i costi. Il loro utilizzo è studiato in modo che l'alimento finale abbia le caratteristiche desiderate in termini di digeribilità, viscosità e morbidezza. Dall'altro lato, gli enzimi endogeni sono quelli naturalmente presenti nelle cellule o nei tessuti che costituiscono i cibi o i loro ingredienti e, non essendo controllati, possono avere effetti desiderati o indesiderati. Per questo spesso, nonostante l'evidente vantaggio economico derivante dallo sfruttamento di enzimi già presenti, si preferisce inoculare colture selezionate anche se le materie prime utilizzate contengono gli enzimi necessari, per controllare meglio il processo e ottenere il prodotto desiderato. In alcuni casi si possono anche distinguere gli enzimi endogeni da quelli indigeni: per esempio nel latte (e di conseguenza nel formaggio), gli enzimi indigeni sono quelli che provengono dai tessuti mammari, gli enzimi endogeni vengono secreti nel latte o nei latticini da microrganismi contaminanti aggiunti come coltura. (24,25)

Il vino è un esempio di prodotto per cui vengono utilizzati enzimi esogeni nonostante l'uva contenga gli enzimi necessari, derivanti anche da lieviti, funghi e batteri presenti nel frutto: è pratica comune aggiungere enzimi esogeni commerciali come pectinasi, glucanasi e glicosidasi per potenziare l'attività degli enzimi prodotti dalla microflora indigena, che purtroppo, per quanto importanti, da soli non sarebbero sufficienti ad ottenere risultati regolari per un vino di alta qualità (21,26). Ad esempio le pectinasi, descritte in precedenza, sono presenti nella frutta, e il loro ruolo in natura è quello di degradare la pectina durante la maturazione per rendere il frutto più morbido, ma nella produzione del vino è necessario usare anche pectinasi esogene prodotte da microrganismi. Similmente, le glico-

sidasi sono presenti naturalmente in basse quantità e devono essere spesso integrate con enzimi esogeni: in molte varietà di uva i precursori dell'aroma (terpeni, derivati benzoici, fenoli) non vengono espressi perché sono legati a molecole di zucchero. Durante l'invecchiamento si ha un naturale lento rilascio di questi composti, ma per accelerare il processo di sviluppo dell'aroma (in particolare per i vini con una shelf-life breve) è richiesta l'aggiunta di glicosidasi esogena. Anche le glucanasi (*Figura 7*) vengono di norma aggiunte da fonti esogene nella produzione del vino per catalizzare l'idrolisi del glucano. Il glucano è un insieme di polisaccaridi presenti nelle pareti cellulari delle piante, che possono anche essere rilasciati nel vino da batteri infestanti e lieviti durante la fermentazione e l'invecchiamento, influenzando negativamente la filtrabilità e la chiarificazione. (27) In futuro, lo studio approfondito degli enzimi endogeni nell'uva permetterà di aumentare la loro attività nelle varie fasi del processo e di evitare di dover ricorrere in modo così massiccio agli enzimi esogeni.

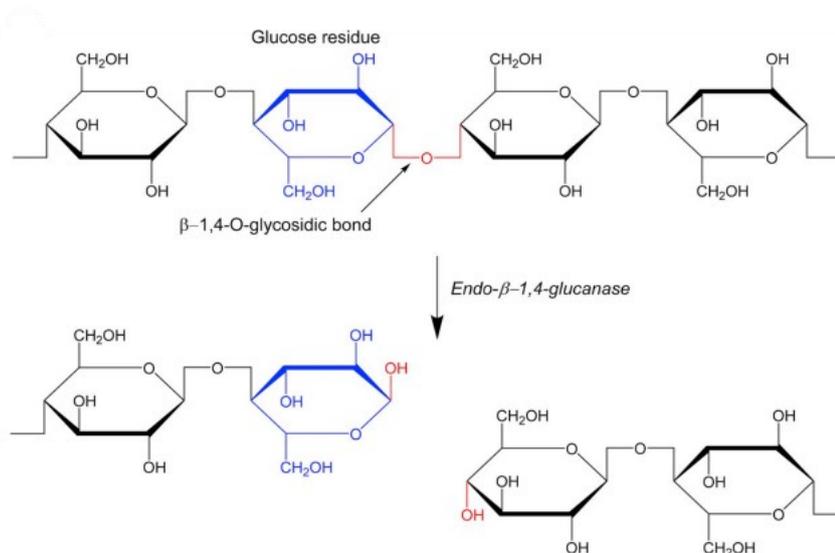


Figura 7. Reazione catalizzata dalla glucanasi.

Anche nella farina sono presenti enzimi endogeni, che vengono sfruttati da millenni nella panificazione, anche se inizialmente senza la consapevolezza della loro funzione. Dopo la scoperta dell'effetto di questi catalizzatori biochimici è iniziato l'utilizzo di enzimi estratti da animali, piante o microrganismi: la prima applicazione di un enzima esogeno nella preparazione di prodotti da forno, una tendenza tuttora praticata, è la correzione della quantità di α -amilasi, grazie all'aggiunta del malto, per integrare quella endogena e raggiungere la concentrazione

ottimale di questo importante enzima. Oltre al malto, l' α -amilasi esogena più utilizzata ha origini fungine. La β -amilasi, invece, è presente nella farina in maggiore quantità, quindi la sua azione endogena è generalmente sufficiente nella produzione dei lievitati. (23) Anche l'emicellulasi, che ha il ruolo di idrolizzare i polisaccaridi di arabinosilano presenti nella parete cellulare delle piante, è presente nella farina, ma la quantità endogena è molto bassa rispetto a quella necessaria per svolgere la sua funzione strutturale, quindi l'aggiunta di emicellulasi esogena è pratica comune nella preparazione di prodotti da forno (28). La lipasi endogena rende la farina integrale suscettibile all'irrancidimento degli acidi grassi, che porta alla perdita di funzionalità, di proprietà nutritive e di accettabilità sensoriale. Questo non avviene nella farina bianca perché la lipasi endogena è contenuta principalmente nella crusca e nel germe. La lipasi endogena sembra avere principalmente effetti negativi, tuttavia viene aggiunta per altri motivi lipasi esogena, utile in tutte le fasi della panificazione (impasto, lievitazione, cottura, conservazione), per liberare acidi grassi a catena corta che aumentano il sapore, degradare i lipidi polari della farina e produrre *in situ* lipidi emulsionanti, aumentare la shelf life (29,30). La glucosio ossidasi descritta in precedenza ha origini esogene (viene prodotta principalmente dal fungo *Aspergillus niger*), così come la transglutaminasi (Figura 8), che forma legami cross-link covalenti intermolecolari tra le proteine del glutine, aumentando il grado di reticolazione e modificando drasticamente le proprietà chimico-fisiche e il comportamento reologico dell'impasto.

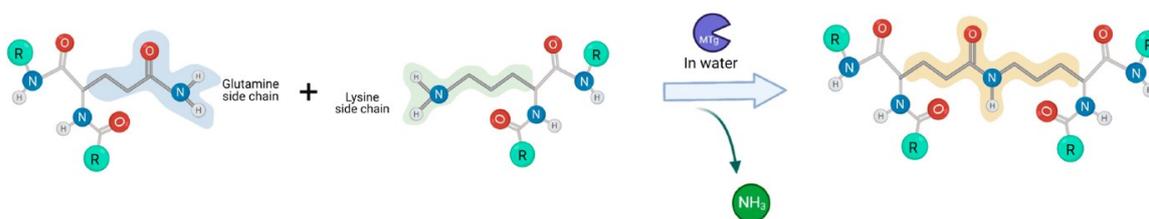


Figura 8. Azione della transglutaminasi

Per quanto riguarda il formaggio, il latte non contiene naturalmente agenti che permettono la coagulazione, quindi la chimosina deve essere prodotta da animali o microrganismi ed essere successivamente aggiunta alla preparazione. Tuttavia, si possono trovare diversi enzimi indigeni ed endogeni molto utili nelle altre fasi della produzione del formaggio, in particolare nella maturazione, durante la quale si sviluppa il sapore e la texture del formaggio. La maturazione è un processo microbico, enzimatico, chimico e fisico che coinvolge enzimi indigeni, en-

dogeni ed esogeni. Gli enzimi indigeni dipendono dagli animali e dalla loro alimentazione e sono molto influenzati dai trattamenti termici subiti dal latte e dalla cagliata; includono le lipasi, che arricchiscono il sapore del formaggio stagionato, e il lisozima, che con il suo effetto battericida ha una funzione di protezione da attività batteriche dannose come la produzione di gas.

Gli enzimi endogeni sono prodotti dalla microflora del latte e dipendono soprattutto dalle condizioni igieniche durante la produzione. Ad esempio, gli enzimi lattici producono acido lattico portando alla coagulazione della caseina. Durante la maturazione del formaggio i batteri lattici muoiono, ma rilasciano enzimi, soprattutto peptidasi, che danno un contributo significativo allo sviluppo del sapore del formaggio. Gli enzimi endogeni e quelli indigeni non sono controllati e possono avere anche effetti negativi, come sapore sgradevole e formazione di gas dannosi. Per questo è importante sottoporre il latte a trattamenti termici e microfiltrazione per abbattere la microflora. Infine, vengono aggiunti specifici enzimi esogeni che influenzano la produzione e la maturazione del formaggio, accelerando il processo, aumentando la resa e migliorando la struttura. Tra questi si trovano le lipasi e le fosfolipasi, usate per modificare il sapore di alcune varietà di formaggio e per modificare le proprietà reologiche attraverso l'interesterificazione dei lipidi del latte (*Figura 9*). (25,31)

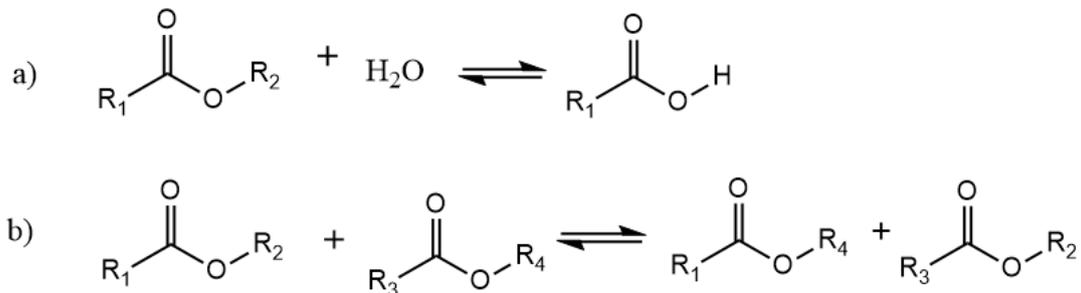


Figura 9. Alcune reazioni catalizzate dalle lipasi: idrolisi (a) e interesterificazione (b).

5. PROSPETTIVE FUTURE

Gli enzimi vengono utilizzati nella produzione alimentare da millenni, direttamente o indirettamente, ma oggi, con la consapevolezza della loro funzione, offrono una possibilità di ottimizzazione dei processi e di miglioramento della qualità dei prodotti. Questo non significa affatto che la nostra conoscenza in proposito sia da tutti i punti di vista approfondita ed esaustiva, e il potenziale di ricerca è ancora grande per una futura innovazione e creazione di nuove texture e sapori negli alimenti.

Per il futuro, visto il generale crescente interesse verso il tema della sostenibilità ambientale, c'è grande attenzione da parte della comunità scientifica verso nuove direzioni in molti ambiti della ricerca, inclusa l'enzimologia: in questo contesto, ad esempio, uno scenario futuro potrebbe essere l'intensificazione della produzione di enzimi attraverso l'utilizzo di OGM, nonostante le attuali riserve verso questi ultimi. Questo permetterebbe di capire a fondo l'ambiente di lavoro degli enzimi e darebbe la possibilità di crescere colture microbiche che producano gli enzimi esogeni desiderati. La risoluzione della struttura degli enzimi permette la comprensione delle ragioni molecolari che stanno alla base della specificità di un enzima verso un determinato substrato. Comprendendo a livello molecolare il meccanismo di secrezione di questi enzimi sarà possibile manipolare i microrganismi per fare in modo che producano in grandi quantità gli enzimi efficaci. I programmi di ricerca porteranno nei prossimi anni ad una sempre crescente gamma di enzimi disponibili da usare nei processi, per adattarsi alla funzionalità, stabilità e proprietà sensoriali desiderate in un alimento. (32)

Il mercato degli enzimi è in espansione grazie al loro potenziale di applicazione e ai vantaggi che il loro utilizzo porta con sé. Nonostante questo, però, gli enzimi hanno problemi di stabilità, e il loro costo, insieme alla mancanza di alcune specifiche caratteristiche, rallenta il loro avanzamento. (33) Un aspetto su cui c'è ancora molto lavoro da fare riguarda dunque i costi di produzione: l'instabilità alle condizioni tipiche dei processi industriali (temperature elevate per tempi prolungati) porta da una parte ad una maggiore richiesta di enzimi dovuta alla loro disattivazione, dall'altra ai costi relativi alla conservazione degli enzimi a basse temperature. L'ingegnerizzazione delle proteine permetterà di ottenere enzimi più robusti e versatili e l'ottimizzazione dei processi di produzione completerà questo approccio all'uso degli enzimi.

Mantenere le temperature adeguate agli enzimi per l'intero processo è costoso, quindi si cercano enzimi termostabili. Ci si sta quindi concentrando su fonti microbiche con un'alta attività enzimatica extracellulare e stabili in un ampio intervallo di temperature e pH, per simulare al meglio le possibili condizioni in un impianto industriale. (34,35) La già citata modifica genetica dei microrganismi che producono gli enzimi è un metodo per controllare meglio la produzione e ridurre i costi. Per aumentare la sostenibilità ambientale, si utilizzano anche gli scarti delle industrie agro-alimentari come substrato per la crescita di microrganismi in grado di produrre enzimi che poi verranno utilizzati da altre industrie. (33)

Infine, una tecnica molto promettente per rendere competitiva l'applicazione degli enzimi su larga scala è l'immobilizzazione su un supporto, per poter riutilizzare gli enzimi e controllarne l'attività, rendendo economicamente sostenibile il loro impiego. I tipi di supporto possono essere diversi, in base agli enzimi e alla reazione da catalizzare, ma in ogni caso la catalisi deve essere eterogenea, quindi il substrato deve essere insolubile in mezzi acquosi e in solventi organici e deve presentarsi in una fase diversa rispetto ai substrati e ai prodotti. (36)

6. CONCLUSIONI

L'utilizzo di enzimi nella produzione alimentare rende possibili molte reazioni che portano dalle materie prime all'alimento finito, e che hanno una cinetica troppo lenta per avvenire spontaneamente. Gli enzimi alimentari sono quindi molto interessanti perché sono in grado di evitare un massiccio utilizzo di acqua, energia e agenti chimici pericolosi. Rispetto ad altri catalizzatori, inoltre, vantano una maggiore specificità verso i substrati, sono prodotti naturali ed ecosostenibili e spesso non è richiesta la loro citazione in etichetta come additivi alimentari. A volte gli enzimi necessari sono naturalmente presenti nelle materie prime (enzimi endogeni), ma in molti casi non sono sufficienti a svolgere in maniera ottimale la loro funzione, soprattutto per una produzione su scala industriale e per soddisfare le esigenze dei consumatori. Per questo è pratica comune sfruttare colture selezionate di batteri o funghi per produrre gli enzimi necessari (esogeni), che vengono poi aggiunti nella formulazione dell'alimento.

Bisogna notare che alcuni enzimi sono intrinseci nella produzione di un alimento, mentre altri servono solo ad aggiungere alcune caratteristiche per migliorare il prodotto. Formaggio, vino e prodotti lievitati sono esempi di alimenti che richiedono l'utilizzo di enzimi. Nella loro produzione si utilizza comunemente una grande quantità di enzimi, che appartengono a diverse classi (soprattutto idrolasi, ossidoriduttasi e transferasi), per raggiungere una serie di obiettivi e caratteristiche desiderabili, che vanno dalla fondamentale coagulazione del latte per fare il formaggio alla riduzione dei tempi di lavorazione, dalla produzione di sapore durante la stagionatura all'estrazione dell'aroma e del colore dalle bucce degli acini d'uva, dalla limpidezza del vino al volume del pane alla produzione di zuccheri fermentescibili utilizzati dai lieviti, dal miglioramento della struttura all'aumento della stabilità del prodotto.

In un'ottica di sviluppo futuro, gli enzimologi sono alla ricerca di nuovi enzimi, che siano da una parte in grado di catalizzare nuove reazioni per aggiungere caratteristiche all'alimento, dall'altra più resistenti alla disattivazione in condizioni ambientali sfavorevoli. Si cerca inoltre di raggiungere una conoscenza più approfondita sugli enzimi endogeni in modo da aumentare la loro attività ed evitare di dover ricorrere agli enzimi esogeni, e si sta lavorando alla ricerca di organismi geneticamente modificati che possano produrre enzimi in grande quantità ad un costo contenuto.

BIBLIOGRAFIA

1. Van Oort M. Enzymes in Food Technology – Introduction. In: Whitehurst RJ, Van Oort M, editors. Enzymes in Food Technology. 1^a Wiley Online Library; 2009. p. 1–17.
2. Dutt Tripathi A, Darani KK, Srivastava SK, Eds. Novel Food Grade Enzymes: Applications in Food Processing and Preservation Industries. Singapore: Springer Nature Singapore; 2022.
3. Copeland RA. Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. 1^a ed. Wiley; 2023.
4. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech. dicembre 2016;6(2):174.
5. Regolamento (UE) n. 1169/2011 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 25 ottobre 2011, relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione. Testo rilevante ai fini del SEE.
6. Appunti lezione di Chimica degli alimenti, prof. Elisabetta Schievano, A.A. 2023-24, Laurea in Chimica Industriale, Università di Padova.
7. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP), Lambré C, Barat Baviera JM, Bolognesi C, Cocconcelli PS, Crebelli R, et al. Food manufacturing processes and technical data used in the exposure assessment of food enzymes. EFSA J. luglio 2023;21(7).
8. Martinez-Anaya MA. Enzymes and Bread Flavor. J Agric Food Chem. 1996;44(9):2469–2480.
9. Aiyer PV. Amylases and their applications. Afr J Biotechnol. 2005;4(13):1525–1529.
10. Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochem. giugno 2003;38(11):1599–1616.
11. Van Oort M. Enzymes in Bread Making. In: Whitehurst RJ, Van Oort M, curatori. Enzymes in Food Technology. 1^a ed. Wiley; 2009. 103–143.
12. Wong CM, Wong KH, Chen XD. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol. aprile 2008;78(6):927–938.
13. Bankar SB, Bule MV, Singhal RS, Ananthanarayan L. Glucose oxidase — An overview. Biotechnol Adv. luglio 2009;27(4):489–501.

14. Mohanty AK, Mukhopadhyay UK, Grover S, Batish VK. Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnol Adv.* 1999;17:205–217.
15. Law BA. Enzymes in Dairy Product Manufacture. In: Whitehurst RJ, Van Oort M, curatori. *Enzymes in Food Technology.* 1^a ed. Wiley; 2009. p. 88–102.
16. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Am Soc Microbiol.* 1998;62(3):597–635.
17. BeMiller JN. An Introduction to Pectins: Structure and Properties. Fishman and Jen; Chemistry and Function of Pectins ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1986;2–12.
18. Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol.* 2001;77(3):215–227.
19. Bruchmann A, Fauveau C. Enzymes in Potable Alcohol and Wine Production. In: Whitehurst RJ, Van Oort M, editors. *Enzymes in Food Technology.* 1^a Wiley Oline Library; 2009. p. 195–210.
20. Khan M, Nakkeeran E, Umesh-Kumar S. Potential Application of Pectinase in Developing Functional Foods. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2013;4(1):21–34.
21. Espejo F. Role of commercial enzymes in wine production: a critical review of recent research. *J Food Sci Technol.* 2021;58(1):9–21.
22. Mata-Gómez MA, Heerd D, Oyanguren-García I, Barbero F, Rito-Palomares M, Fernández-Lahore M. A novel pectin-degrading enzyme complex from *Aspergillus sojae* ATCC 20235 mutants. *J Sci Food Agric.* 2015;95(7):1554–1561.
23. Aminlari M. Plant- and Animal-Derived Enzymes and Their Potential Application in Food Processing and Preservation. In: Dutt Tripathi A, Darani KK, Rai DC, Paul V, curatori. *Biodegradable Polymer-Based Food Packaging.* Singapore: Springer Nature Singapore; 2022, 41–80.
24. Motta JFG, Freitas BCBD, Almeida AFD, Martins GADS, Borges SV. Use of enzymes in the food industry: a review. *Food Sci Technol.* 2023;43.
25. Fox P. Enzymology of Milk and Dairy Products: Overview. In: Kelly AL, Larsen LB, editors. *Agents of Change.* Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 1–10. (Food Engineering Series).
26. Gómez-Plaza E, Romero-Cascales I, Bautista-Ortín AB. Use of enzymes for wine production. In: *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing.* Taylor & Francis Group 2010. p. 229–258.
27. Sahay S. Wine Enzymes: Potential and Practices. In: *Enzymes in Food Biotechnology.* Elsevier; 2019. p. 73–92.

28. Hille JD, Schooneveld-Bergmans ME. Hemicellulases and their synergism in breadmaking. *Cereal Foods World*. 2004;49(5):283.
29. Aravindan R, Anbumathi P, Viruthagiri T. Lipase applications in food industry. *INDIAN J Biotechnol*. 2007;
30. Gerits LR, Pareyt B, Decamps K, Delcour JA. Lipases and Their Functionality in the Production of Wheat-Based Food Systems. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. settembre 2014;13(5):978–89.
31. Ardö Y. Enzymes in Cheese Ripening. In: Kelly AL, Larsen LB, curatori. *Agents of Change*. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 363–95. (Food Engineering Series).
32. Kelly AL, Crowley SV, Crotty A, Meng F, Larsen LB. Future Opportunities and Challenges in Dairy Enzymology. In: Kelly AL, Larsen LB, curatori. *Agents of Change*. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 525–41. (Food Engineering Series).
33. Panesar PS, Kaur R, Singla G, Sangwan RS. Bio-processing of Agro-industrial Wastes for Production of Food-grade Enzymes: Progress and Prospects. *Appl Food Biotechnol*. 2016;3(4):208–27.
34. Garg G, Singh A, Kaur A, Singh R, Kaur J, Mahajan R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*. giugno 2016;6(1):47.
35. Shet AR, Desai SV, Achappa S. Pectinolytic Enzymes: Classification, Production, Purification and Applications. *Res J Life Sci Bioinforma Pharm Chem Sci*. 4(3).
36. Souza LTDA, Veríssimo LAA, João BCP, Santoro MM, Resende RR, Mendes AA. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol 4*. 1ª ed. Editora Blucher; 2017. p. 529–68.