



ALESSIA GIOIELLO, ILARIA FINORE, ANNARITA POLI, BARBARA NICOLAUS  
 CNR - ISTITUTO DI CHIMICA BIOMOLECOLARE (ICB)  
 POZZUOLI (NA)  
 BNICOLAUS@ICB.CNR.IT

# ESTREMOZIMI E BIOTECNOLOGIE DEL FUTURO

*Gli enzimi prodotti dai microrganismi estremofili sono in grado di espletare la loro funzione in condizioni estreme di temperature, pH, salinità, pressione ed, ancora, in presenza di solventi organici, agenti inquinanti e detergenti; tali caratteristiche ne permettono l'uso in svariati processi produttivi industriali.*

**Gli estremozimi e le loro applicazioni**

 <p style="text-align: center;"><b>Termofili</b></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Amilasi (Bioetanolo - Industria alimentare)</li> <li>Proteasi (Industria alimentare)</li> <li>Cellulasi (Detergenti)</li> <li>DNA polimerasi (Biologia molecolare, PCR)</li> <li>Xilanasi (Produzione della birra - Candeggio della carta)</li> </ul> 	 <p style="text-align: center;"><b>Psicrofili</b></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Proteasi (Detergenti)</li> <li>β-galattosidasi (Industria alimentare)</li> <li>Fosfatasi alcaline (Biologia molecolare)</li> <li>Xilanasi (Industria alimentare)</li> </ul> 	 <p style="text-align: center;"><b>Alofili Alcalofili</b></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Lipasi (Industria alimentare)</li> <li>Proteasi (Detergenti)</li> </ul> 
---	--	--

**G**li estremofili (dal latino *extremus* e dal greco *philia*) sono organismi in grado di sopravvivere in condizioni proibitive dal punto di vista fisico e chimico, dove la maggior parte degli organismi viventi sulla terra (mesofili) sopravviverebbe con grande difficoltà o andrebbe incontro a morte (Fig. 1). Questi microrganismi, che sono in grado di svolgere ogni funzione vitale in ambienti caratterizzati da uno o molteplici stress chimico-fisici, risultano particolarmente interessanti per il mondo scientifico, per il loro potenziale applicativo in campo industriale e nei processi di biorisanamento [1]. La crescente disponibilità di tecnologie genetiche avanzate ha consentito, e tuttora consente, l'identificazione di nuovi metaboliti ed enzimi utili per applicazioni in campo

medico, agroalimentare e industriale, tanto che i microrganismi vengono ora considerati a tutti gli effetti delle fabbriche cellulari (*cell factories*) [2, 3]. Negli ultimi anni, gli studi mediante approcci innovativi (ad esempio l'approccio metagenomico *sequence-based screening*, rappresenta un modo innovativo per identificare nuovi termozimi da microrganismi termofili e ipertermofili) hanno prodotto approfondite conoscenze sul rapporto struttura e funzione degli enzimi presenti nei microrganismi termofili [4]; per il futuro si prevede che l'utilizzo di questi biocatalizzatori ridurrà la distanza tra i processi chimici classici e i processi biotecnologici. Sono stati caratterizzati enzimi stabili ed attivi da pH 1 a 11, a temperature tra 0 °C ed oltre 100 °C, ad elevate concentrazioni



Fig. 1 - Ambienti estremi e microrganismi estremofili

saline, nei solventi organici, nei detergenti etc. [5]. I vantaggi che ne derivano sono notevoli: ridotto rischio di contaminazione da parte di altri microrganismi (per esempio la biomassa può essere considerata un contaminante da eliminare se il prodotto ottenuto è da destinarsi ad esempio al mercato farmaceutico), diminuzione della viscosità, aumento della solubilità del substrato, aumento della velocità di trasferimento di massa; in aggiunta, tutti questi fattori consentono di indirizzare un processo verso la produzione di un determinato composto o minimizzare la formazione di prodotti indesiderati. In particolare, nei processi condotti a temperature superiori ai 50 °C, in cui si ottiene un alto grado di diffusione e solubilità di composti, una ridotta viscosità e tensione superficiale, un facile recupero di prodotti volatili e la soppressione di organismi patogeni per l'uomo, l'impiego di batteri termofili va sostituendo i tradizionali mesofili perché i loro enzimi non si denaturano alle alte temperature [2, 3].

### Enzimi da microrganismi termofili

I microrganismi termofili e ipertermofili, che prosperano in un intervallo di temperature da 50 a 110 °C, sono fonte di enzimi che catalizzano reazioni ad elevate temperature: i termozimi. Al loro funzionamento è abbinato un aumento della velocità di reazione, alta solubilità dei substrati e riduzione del rischio di contaminazione da parte di altri microrganismi. Inoltre, l'aumento di temperatura ha una notevole influenza su biodisponibilità e solubilità dei composti organici ed è accompagnato da

una diminuzione della viscosità e da un aumento del coefficiente di diffusione di composti organici. Numerosi sono i batteri termofili e ipertermofili produttori di enzimi attivi alle elevate temperature, quali ad esempio cellulasi, amilasi, xilanasi, lipasi, esterasi, etc. [6-10].

### Amilasi da termofili

Le  $\alpha$ -amilasi (EC 3.2.1.1) sono enzimi che degradano il legame glicosidico delle lunghe catene polisaccaridiche dell'amido. Una delle applicazioni industriali più diffuse delle termo-amilasi riguarda il settore alimentare, per l'ottenimento di sciroppi di glucosio-fruttosio.

L'amido, disponibile in natura sotto forma granulare [11], si compone di unità di  $\alpha$ -glucosio unite da legami  $\alpha$ -1,4- o  $\alpha$ -1,6-glicosidici, formando due componenti ad alto peso molecolare: l'amilosio (15±25%), un polimero lineare costituito da legami  $\alpha$ -1,4-glicosidici e l'amilopectina (75±85%), polimero ramificato contenente legami  $\alpha$ -1,6 nel punto di ramificazione [12]. Convenzionalmente, propedeutica alla completa idrolisi enzimatica dell'amido è la cosiddetta fase di gelatinizzazione, in cui i granuli vengono idratati alle alte temperature (105-150 °C) con la loro conseguente dissoluzione e formazione di un composto viscoso attaccabile dagli enzimi amilolitici durante la successiva fase di liquefazione che porta alla formazione di maltodestrine e una conseguente riduzione della viscosità; segue la saccharificazione con l'intervento delle gluco-amilasi o  $\beta$ -amilasi (EC 3.2.1.2), se i prodotti desiderati sono glucosio o maltosio, rispettivamente. Pertanto, è auspicabile individuare termo-amilasi capaci di attaccare l'amido nella sua forma granulare evitando la fase iniziale di cottura e i costi energetici ad esso associati. Inizialmente, veniva usata l' $\alpha$ -amilasi di *Bacillus amyloliquefaciens*, sostituita poi dall' $\alpha$ -amilasi di *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus licheniformis* [13] (Tab. 1).

Le amilasi termofile trovano impiego anche nei processi industriali di panificazione. Esse, quando aggiunte all'impasto del pane, degradano l'amido contenuto nelle farine in destrine più piccole, substrato fermentabile dal lievito. L'aggiunta di  $\alpha$ -amilasi in generale nei prodotti da forno, quindi, migliora la

Microrganismo	Enzima	Applicazione/Industria	Ref.
<i>Bacillus sp. SMA-2</i>	Cellulasi	Detergenti	[9]
<i>Bacillus licheniformis</i>	$\alpha$ -amilasi	Panificazione/Novozymes	[13]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Amilasi	Panificazione	[13]
<i>Thermoactinomyces thalophilus</i>	Xilanasi	Candeggio carta	[20]
<i>Bacillus licheniformis</i>	Proteasi (subtilisina)	Industria alimentare/Novozymes	[22]
<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	Termolisina	Sintesi aspartame	[23]
<i>Thermus aquaticus</i>	Taq polimerasi	Reazioni di PCR/VWR Chemicals	[24]
<i>Bacillus</i>	Fosfatasi alcalina	New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA, USA)	[26, 28]
<i>Bacillus TA39</i>	Subtilisina	Detergenti	[28]
<i>Pseudoalteromonas</i>	Beta-galattosidasi	Nutrilab NV (Belgio)	[29]
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis TAH3a</i>	Xilanasi	Panificazione/Puratos	[30]
<i>Pseudomonas rutenica CP76</i>	Aloproteasi	Formulazione detergenti	[32]
<i>Virgibacillus sp.</i>	Chitinasi	Azione di biocontrollo	[39]
<i>Marinobacter lipolyticus SM19</i>	Lipasi	Industria alimentare	[40]
<i>Bacillus halodurans</i>	Subtilisina 147	Formulazione detergenti/Novozymes	[41]
<i>Bacillus clausii</i>	Subtilisina 309	Formulazione detergenti/Novozymes	[41]
<i>Bacillus licheniformis</i>	Proteasi RP1	Formulazione detergenti	[42]
<i>Pseudomonas stutzeri PS59</i>	Lipasi	Formulazione di detergenti	[43]
<i>Bacillus cereus GA6</i>	$\alpha$ -amilasi	Formulazione di detergenti	[44]
<i>Shewanella sp.</i>	Nucleasi	Biologia molecolare/Takara-Clontech (Mountain View, CA, USA)	[45]
<i>Thermus sp.</i>	Amilasi	Produzione di bioetanolo	[46]
<i>Humicola insoles</i>	Xilanasi	Produzione birra	[47]
<i>Thermotoga maritima</i>	Xilanasi	Industria della carta	[48]
<i>Pyrococcus chitonophagus</i>	Chitinasi	Biocatalisi in processi industriali	[49]
<i>Sulfolobus</i>	Isoamilasi	Conversione dell'amido	[50]

Tab. 1 - Enzimi da microrganismi estremofili con applicazioni commerciali

velocità di fermentazione con riduzione della viscosità e conseguente miglioramento del volume, della consistenza e della durata di conservazione [13].

### Cellulasi da termofili

Le cellulasi catalizzano l'idrolisi del legame  $\beta$ -1,4-glicosidico della cellulosa, principale componente (40-50%) delle biomasse lignocellulosiche. In base al tipo di reazione catalizzata si distinguono varie classi di cellulasi, la cui azione, in sequenza, porta alla degradazione del polisaccaride in subunità semplici di glucosio: l'endocellulasi (EC 3.2.1.4) idroliz-

za i legami glicosidici interni alla catena polisaccaridica in modo casuale. L'esocellulasi (EC 3.2.1.91) agisce sull'estremità delle catene polisaccaridiche, liberando glucosio o cellobiosio come maggiori prodotti. Successivamente la  $\beta$ -glucosidasi (EC 3.2.1.21) idrolizza cellodestrine e cellobiosio all'estremità non riducente della catena, scindendo i dimeri in singoli monomeri di glucosio [14]. Le cellulasi da microrganismi termofili trovano ampie applicazioni nelle industrie alimentari, come nella produzione di caffè, nelle industrie tessili, nel settore farmaceutico, nella produzione di biocarburanti o anche nella



formulazione di detersivi. In quest'ultimo settore, questi enzimi aumentano la luminosità del colore e sono in grado di rimuovere lo sporco particellare. Uno dei requisiti affinché gli enzimi possano essere utilizzati nella produzione di detersivi a livello industriale è la loro compatibilità e resistenza ai detersivi già in commercio; è il caso della cellulasi prodotta dal *Bacillus sp.* SMIA-2, compatibile con vari detersivi [9] (Tab. 1). Tale batterio, produce attività avicelasi (EC 3.2.1.91), esoglucanasi attiva su uno specifico substrato cristallino (Avicel) ed attività carbossi-metil-cellulasica (CMCasi) (EC 3.2.1.4), endoglucanasi attiva su un substrato solubile della cellulosa (CMC). Entrambe le attività sono prodotte a 50 °C in colture liquide contenenti canna da zucchero e mais. L'avicelasi e la CMCasi presentano un'attività ottimale a 70 °C e a pH 7,5 e 8,0, rispettivamente, ed entrambi gli enzimi restano stabili al 100% a 60 °C per 1 h. In aggiunta, i test di compatibilità ai detersivi testati, mostrano una più elevata stabilità delle cellulasi in presenza di Ultra Biz® e meno con Ariel®. Inoltre, le cellulasi sono stabili in presenza di sodio dodecil solfato e RENEX-95, ed inibiti da TritonX-100 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [9].

### Xilanasi da termofili

Un'altra categoria di enzimi prodotta dai termofili con potenziali applicazioni a livello industriale è quella delle xilanasi, che idrolizzano il legame D-β-D-1,4 xilosidico contenuto nello xilano, importante polisaccaride delle cellule vegetali. Lo xilano è costituito da una catena principale di unità di D-β-xilopiranosio (legame 1→4), sulla quale possono innestarsi ramificazioni costituite da xilosio, oppure da altri zuccheri pentosi o esosi, come arabinosio, mannosio, galattosio, glucosio. Data la sua complessità e variabilità strutturali, l'idrolisi completa dello xilano richiede una grande varietà di enzimi che agiscono tra loro in modo cooperativo: l'endo-β-D-1,4-xilanasi (EC 3.2.1.8) rompe casualmente lo scheletro della catena di xilano con la produzione di catene xilo-oligomeriche medio-lunghe e la β-D-xilosidasi (EC 3.2.1.37) invece libera i monomeri di xilosio all'estremità non riducente di xilo-oligosaccaridi e di xilobiosio, mentre la rottura degli altri gruppi, quali residui di acido glucuronico, arabinofuranosio o gruppi acetilici, avviene ad opera di enzimi accessori come α-L-arabinofuranosidasi, α-D-glucuronidasi, acetilxilano esterasi (Fig. 2) [15,

16]. Le xilanasi sono prodotte su scala industriale e usate come additivi nel mangime per pollame per aumentare l'apporto nutrizionale [17] e nel grano per facilitare la manipolazione della pasta e migliorare la qualità dei prodotti da forno [18]. Tuttavia, la principale applicazione delle xilanasi termostabili ricade nel candeggio della carta [19], processo che viene effettuato allo scopo di rimuovere le impurità di lignina residue, che si presentano come macchie di colore scuro, a livello della polpa di cellulosa. Il trattamento tradizionale prevede l'utilizzo di cloro con il conseguente rilascio di residui di cloro-derivati della lignina; solo negli USA ogni anno vengono smaltite più di 2 mila tonnellate di cloro-derivati con notevole impatto ambientale. Per questo motivo, vari studi effettuati hanno dimostrato l'efficacia del trattamento enzimatico per lo sbiancamento della carta in alternativa al trattamento con cloro o comunque nelle prime fasi del processo. Infatti l'utilizzo di xilanasi alle elevate temperature fa in modo che esse aprano la struttura della parete cellulare, facilitando la rimozione di lignina nelle fasi successive del candeggio, favorendo il rilascio di xilano e residui di lignina non clorurati, senza eccessiva perdita di altri componenti. Affinché le xilanasi possano essere utilizzate per questo scopo, devono rispondere ad una serie di requisiti, tra cui mancanza di attività cellulolitica per evitare l'idrolisi della cellulosa, basso peso molecolare (40-80 kDa) per facilitare la loro diffusione all'interno della polpa di cellulosa, attività e stabilità ad alta temperatura ed a pH alcalini. Il batterio *Thermoactinomyces thalophilus* sottogruppo C, produce una xilanasi, cellulasi-free, che risulta essere stabile e attiva a 65 °C a pH alcalino (8,5), mantenendo il

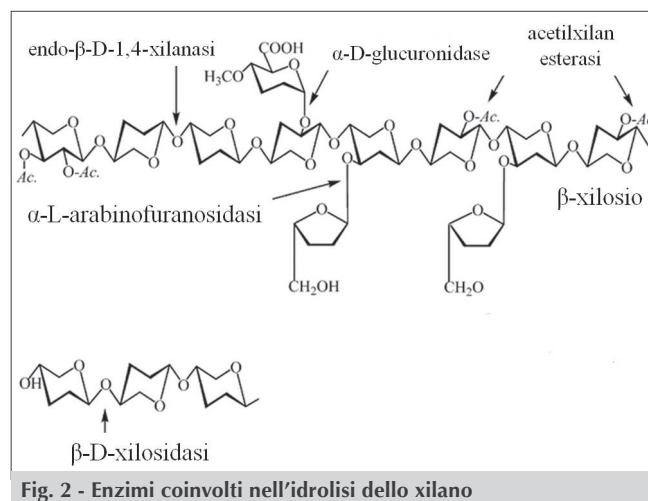


Fig. 2 - Enzimi coinvolti nell'idrolisi dello xilano

50% di attività fino a 125 minuti di incubazione, rendendola idonea per l'industria cartaria [20] (Tab. 1). Le attività extracellulari xilanasica e  $\beta$ -xilosidasica del batterio termofilo *Geobacillus thermantarcticus* isolato in Antartide sono state utilizzate per la valorizzazione della frazione emicellulosica presente negli scarti di *Cynara cardunculus* (foglie e steli) in zuccheri fermentabili e xilo-oligosaccaridi [21].

## Proteasi da termofili

Un'altra classe di enzimi di interesse industriale è rappresentata dalle proteasi che catalizzano la rottura del legame peptidico tra il gruppo amminico e il gruppo carbossilico tra i residui amminoacidici delle proteine. In base al meccanismo catalitico, le proteasi vengono classificate in diversi gruppi come, ad esempio, le serin proteasi (EC 3.4.21) (tripsina e chymotripsina), le aspartil proteasi (pepsina) (EC 3.4.23), le metalloproteasi (EC 3.4.24) (diverse aminopeptidasi). Vi sono proteasi, come le carbossipeptidasi che in generale possono appartenere sia alla classe delle metalloproteasi che delle serin proteasi. In effetti, gli enzimi proteolitici sono quelli maggiormente prodotti nel mondo su scala commerciale. Le applicazioni sono numerose, ad esempio serin proteasi sono utilizzate come additivi nei detersivi domestici, data la loro resistenza alla denaturazione da detersivi e alle condizioni alcaline, le proteasi utilizzate nei detersivi domestici sono anche stabili alle alte temperature; proteasi che mostrano alta attività cheratinolitica possono essere utilizzate nelle industrie di pelletteria e potrebbero inoltre essere usate come catalizzatori per la sintesi peptidica, utilizzando la loro reazione inversa. Un esempio è rappresentato dall'alcalasi o subtilisina di *Bacillus licheniformis*, che mostra una temperatura ottimale di attività a 60 °C e a pH 8,3 e grazie alla bassa specificità verso differenti proteine vegetali e animali trova ampie applicazioni nel settore alimentare (nella lavorazione della farina di soia e negli alimenti dietetici) [22] (Tab. 1). Tra le proteasi termostabili attualmente utilizzate a livello industriale su grande scala c'è, inoltre, la termolisina prodotta da *Bacillus thermoproteolyticus*, che risulta essere coinvolta nella sintesi dell'aspartilfenilalanina 1-metilestere, noto come aspartame [23] (Tab. 1). Questo prodotto è comunemente usato come dolcificante in molti alimenti a basso contenuto calorico e bevande. I termozimi trovano ulteriori applicazioni anche nel campo della

biologia molecolare: un classico esempio è l'utilizzo della DNA polimerasi (Taq polimerasi), prodotta dal microrganismo termofilo *Thermus aquaticus*, nelle reazioni di PCR (*polymerase chain reaction* o reazione a catena della polimerasi) [24] (Tab. 1).

## Enzimi da microrganismi psicrofili

I microrganismi psicrofili, che proliferano in un intervallo di temperature compreso tra 0 e 25 °C, producono numerosi enzimi con diverse applicazioni a livello industriale. Mentre la sfida per un enzima termofilo è facilmente comprensibile, ovvero rimanere stabile e attivo a temperature elevate, per un enzima psicrofilo invece le basse temperature riducono fortemente la velocità di quasi tutte le reazioni e, inoltre, rallentano i movimenti molecolari associati alla funzione della proteina; infatti la costante di velocità di una reazione,  $k_{cat}$  (numero massimo di molecole di substrato convertite nel prodotto al sito attivo per unità di tempo) è esponenzialmente dipendente dalla temperatura. È stato invece osservato che per la maggior parte degli enzimi psicrofili si riduce il valore di energia di attivazione, incrementando la  $k_{cat}$  [25]. Gli enzimi da psicrofili sono attivi alle basse temperature e hanno la caratteristica di essere termolabili indipendentemente dalla stabilità strutturale della proteina, in particolare il sito attivo sembra essere l'elemento strutturale più termolabile di queste proteine. È stato dimostrato che la struttura degli enzimi psicrofili è meno stabile rispetto a quella delle controparti mesofile e termofile. Questi tratti specifici sono responsabili di tre principali vantaggi per cui l'uso di tali enzimi a livello industriale risulta conveniente: la loro elevata attività ne permette un uso ridotto nel processo; inoltre essere attivi alle basse temperature evita il riscaldamento e il costo energetico ad esso associato; la loro termolabilità ne consente, a valle di un processo, un'efficace e selettiva inattivazione, mediante un moderato apporto di calore [26, 27]. Grazie a queste caratteristiche, le applicazioni degli enzimi da psicrofili a livello industriale sono numerose; ad esempio la subtilisina isolata da un batterio *Bacillus* TA39 dell'Antartide, viene impiegata nella formulazione di detersivi, garantendo stabilità allo stoccaggio, stabilità alcalina, e alta attività alle basse temperature [28]. Un ulteriore esempio è rappresentato dalla  $\beta$ -galattosidasi, enzima che idrolizza il lattosio in glucosio e galattosio. Dato che il 75%



della popolazione mondiale soffre di intolleranza al lattosio a causa della carente sintesi di lattasi intestinale negli adulti, una lattasi attiva al freddo prodotta da un batterio antartico è stata brevettata (WO 01/04276A1) per la sua capacità di idrolizzare il lattosio durante la conservazione del latte a basse temperature. Questa lattasi potrà essere anche prodotta in grandi quantità dalla Nutrilab NV (Bekkevoort, Belgio) per idrolizzare il lattosio (come un sottoprodotto dell'industria casearia) ed utilizzare il galattosio che ne deriva per produrre il dolcificante D-tagattosio, un monosaccaride naturale con basso valore calorico ed indice glicemico [29] (Tab. 1). Inoltre, xilanasi psicrofile trovano applicazioni nell'industria alimentare, infatti è stato dimostrato che esse, agendo come additivi, sono efficaci nel migliorare la qualità del pane e incrementano efficientemente il suo volume. Ciò sembra essere correlato all'elevata attività delle xilanasi psicrofile a basse temperature necessarie per il riposo dell'impasto e alla modalità specifica di idrolisi dello xilano. In particolare una xilanasi isolata da un batterio antartico è oggi commercializzata da Puratos (Grand-Bigard, Belgio) [30] (Tab. 1) e sembra essere l'enzima psicrofilo maggiormente prodotto a livello industriale. Nel campo della biologia molecolare, un esempio di applicazione di enzimi da microrganismi psicrofili riguarda il caso della fosfatasi alcalina secreta da un batterio appartenente al genere *Bacillus* e isolato in Antartide, venduta sotto il nome di fosfatasi antartica da New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA, USA); esso viene impiegato nel clonaggio genico per la defosforilazione al terminale 5' di vettori di DNA prima della clonazione per prevenirne la ricircularizzazione; inoltre la sua termolabilità ne consente una facile rimozione, evitando interferenze con le fasi successive [26, 31].

### Enzimi da microrganismi alofili

Un'altra categoria di microrganismi estremofili, utili dal punto di vista industriale, è rappresentata dagli alofili, capaci di proliferare in ambienti ricchi di sali [32, 33]. Dal punto di vista enzimatico, gli enzimi alofili non sono molto diversi rispetto alle controparti termofile o psicrofile, ma si differenziano dal punto di vista chimico per la presenza di un alto contenuto di amminoacidi acidi sulla superficie della proteina, le cui cariche negative attraggono le molecole d'acqua, con la formazione di

legami idrogeno, che mantengono la proteina idrata evitandone la precipitazione [34]. Infatti, dato che la presenza di sale (NaCl o KCl) determina una rimozione di acqua dalle proteine, il problema di una proteina in condizioni di elevate concentrazioni saline è proprio assicurarsi un ritorno in superficie di molecole d'acqua, possibilmente sotto forma di ioni idratati; pertanto la natura altamente acida delle proteine alofile rappresenta un possibile meccanismo per il legame di ioni idratati contrastandone la tendenza a precipitare [35]. Quindi grazie a queste svariate caratteristiche, le potenziali applicazioni degli enzimi alofili sono numerose: come catalizzatori in processi che comportano alto contenuto salino, come agenti stabilizzanti nelle preparazioni cosmetiche; cellulasi alofile sono utilizzate nella produzione di detergenti per bucato e nelle industrie tessili [36]; amilasi alofile per la conversione dell'amido, proteasi alofile per la produzione di detergenti [36, 37]. In particolare, le proteasi da microrganismi alofili presentano tutti i requisiti affinché possano essere utilizzate nella formulazione di detergenti: risultano essere attive e stabili a valori di pH alcalini; mostrano una buona stabilità e attività a temperature relativamente elevate (40-50 °C e anche superiori), sono compatibili con composti detergenti come tensioattivi, profumi e candeggianti (stabilità durante il deposito e lavaggio) e infine, mostrano specificità di idrolisi verso proteine differenti. Un esempio è la proteasi da *Bacillus sp.* SM2014, che mostra tutte le caratteristiche che confermano le sue potenziali applicazioni industriali nella formulazione di detergenti per lavanderie: attività catalitica a valori di pH alcalini (10,0), ad elevate temperature (60 °C), a concentrazioni saline fino a 3 M e risulta essere compatibile con diversi detergenti e tensioattivi testati [38].

### Ringraziamenti

Questo lavoro è stato parzialmente supportato dal Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica [PON03PE\_00107\_1/1 "Sviluppo di tecnologie verdi per la produzione di BIOchemicals per la sintesi e l'applicazione industriale di materiali POLImerici a partire da biomasse agricole ottenute da sistemi colturali sostenibili nella Regione Campania - BioPolis"] nell'ambito del Progetto Programma Operativo Nazionale R&C 2007-2013.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] T.L. Peeples, in *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 2014, pp. 251-268.
- [2] B. van den Burg, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2003, **6**, 213.
- [3] G.Z.L. Dalmaso *et al.*, *Mar. Drugs*, 2015, **13**(4), 1925.
- [4] R. Barone *et al.*, *Front. Mar. Sci.*, 2014, **1**(38), 1.
- [5] K.O. Stetter, *FEBS Letters*, 1999, **452**, 22.
- [6] C. Vieille, G.J. Zeikus, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2001, **65**, 1.
- [7] S. Kumar, R. Nussinov, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001, **58**, 1216.
- [8] L. Kumar *et al.*, *Extremophiles*, 2011, **10**, 121.
- [9] S.A. Ladeira *et al.*, *Electron J. Biotechnol.*, 2015, **18**, 110.
- [10] B. Cobucci-Ponzano *et al.*, *Methods Enzymol.*, 2012, **510**, 273.
- [11] D. Blazek *et al.*, *Genes Dev.*, 2011, **25**, 2158.
- [12] D.M. Hoover *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001, **42**, 39021.
- [13] M.J. Van der Maarel *et al.*, *J. Biotech.*, 2002, **94**, 137.
- [14] S. Sadhu, K.T. Maiti, *Br. Microbiol. Res. J.*, 2013, **3**, 235.
- [15] T. Collins *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, **29**, 3.
- [16] B. Cobucci-Ponzano, *Enzyme Microb. Technol.*, 2015, **78**, 63.
- [17] G. Annison, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1992, **38**, 105.
- [18] J. Maat *et al.*, *Xylans and Xylanases*, J. Visser *et al.* (Eds.), Elsevier, 1992, pp. 349-360.
- [19] L. Viikari *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994, **13**, 335.
- [20] U. Kohli *et al.*, *Enzyme Microbial. Technol.*, 2001, **28**, 606.
- [21] I. Finore *et al.*, *Green Chem.*, 2016, **18**, 2460.
- [22] J. Synowiecki, *Afr. J. Biotechnol.*, 2010, **9**(42), 7020.
- [23] L. De Martin *et al.*, *Tetrahedron Letters*, 2001, **42**, 3395.
- [24] T.C. Lorenz, *J. Vis. Exp.* 2012, **63**, e3998.
- [25] K.S. Siddiqui *et al.*, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 2013, **41**, 87.
- [26] G. Feller, *Scientifica*, 2013, DOI: 10.1155/2013/512840.
- [27] R. Cavicchioli *et al.*, *Microb. Biotechnol.*, 2011, **4**(4), 449.
- [28] E. Narinx, *Protein Eng.*, 1997, **10**, 1271.
- [29] A. Hoyoux *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 1529.
- [30] E. Dornez *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 6369.
- [31] D. Koutsoulis *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, 2008, **21**, 319.
- [32] M.L. Moreno *et al.*, *Life*, 2013, **3**(1), 38.
- [33] A. Oren, *Environ. Technol.*, 2010, **31**, 825.
- [34] S. Patel, M. Saraf, *Sustainable Development and Biodiversity 6*, Springer International Publishing Switzerland, 2015, Chapter 15.
- [35] M.J. Danson, D.W. Hough, *Trends Microbiol.*, 1998, **6**(8), 307.
- [36] M.J. Coronado *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, **183**, 67.
- [37] L. Lama *et al.*, *Res. Microbiol.*, 2005, **156**, 478.
- [38] D. Jain *et al.*, *Bioresour. Technol.*, 2012, **115**, 228.
- [39] B. Essghaier *et al.*, *J. Appl. Microbiol.*, 2009, **106**, 833.
- [40] D. Pérez *et al.*, *Plos One*, 2011, **6**, e23325
- [41] K.H. Maurer, *Curr. Opin. Biotech.*, 2004, **15**, 330.
- [42] Sellami- Kamoun *et al.*, *Microbiol. Res.*, 2008, **163**, 299.
- [43] X.L. Li *et al.*, *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 2014, **102**, 16.
- [44] R. Roohi *et al.*, *J. Biochem. Technol.*, 2013, **4**, 636.
- [45] N. Awazu *et al.*, US Patent N°8034597B2, 2011.
- [46] A. Fatoni, Zufahair, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 2012, **34**, 525.
- [47] Y. Du *et al.*, *Bioresour. Technol.*, 2013, **130**, 161.
- [48] C.C. Chen *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.*, 1997, **20**, 39.
- [49] E. Andronopoulou, C.E. Vorgias, *Protein. Expr. Purif.*, 2004, **35**, 264.
- [50] N. Tsutsumi *et al.*, Pat. App. WO 99/01545, 1999.

### Extremozymes and Future Biotechnologies

The enzymes produced by extremophilic microorganisms are able to operate in extreme conditions of temperature, pH, salinity, pressure and still in the presence of organic solvents, polluting agents and detergents; these characteristics allow use in various industrial manufacturing processes.