

17

Microbiologia industriale

La **microbiologia** industriale è una delle discipline microbiologiche che confluiscono nel settore delle **biotecnologie**, il cui **campo di interesse** è stato così definito: «l'uso integrato di microbiologia, biochimica e ingegneria, al fine di realizzare l'applicazione industriale delle capacità potenziali di microrganismi, cellule di tessuti coltivati e loro parti» (definizione della Federazione Europea di Biotecnologia, 1981). Anche se questa definizione appare ormai inadeguata per descrivere un ambito scientifico oggi straordinariamente vasto e articolato (fig. 17.1), essa risulta ancora utile per delineare l'ambito della microbiologia industriale, il cui oggetto di interesse sono i **microrganismi utilizzati, in condizioni controllate, come agenti biologici per ottenere beni e servizi**. Per dirla con il grande biochimico J.B.S. Haldane, «perché dannarsi a produrre composti che un microrganismo può produrre per voi?».

17.1 Tipi di processi

Alla base dell'evoluzione scientifica dei moderni processi di microbiologia industriale (tab. 17.1) si collocano le trasformazioni di materie prime alimentari, nate come esempi di utilizzazione del tutto inconsapevole del metabolismo microbico e, successivamente, sviluppatesi come **biotecnologie di tipo tradizionale**. Esempi di questi processi sono stati la produzione di vino, birra e aceto. La successiva evoluzione, che ha posto le basi per le moderne biotecnologie, è rappresentata dalla produzione dapprima di biomasse di lievito per panificazione (*Saccharomyces cerevisiae*) e successivamente di metaboliti isolabili. I primi metaboliti sono stati prodotti a partire dalla fermentazione acetone-butilica di *Clostridium acetobutylicum*: butanolo e acetone, quest'ultimo richiesto in grande quantità dall'industria della prima guerra mondiale per la composizione di polveri piriche.

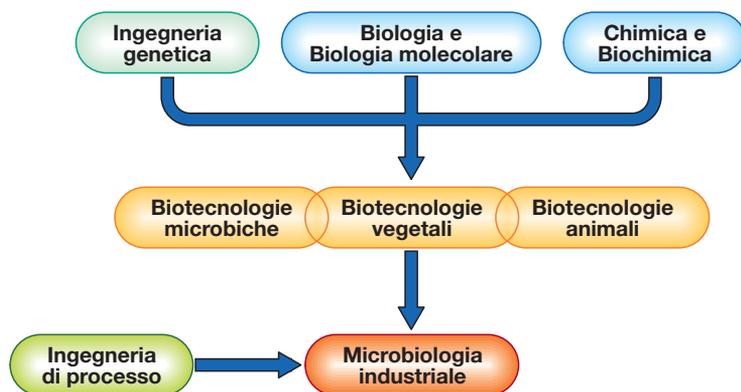


Figura 17.1
Discipline scientifiche e tecnologiche coinvolte nei processi di microbiologia industriale.

Tabella 17.1 L'evoluzione storica della microbiologia industriale.

Anni	Eventi
4000 a.C. (?) (Egitto e Mesopotamia)	"Archeobiotecnologie" (prime testimonianze della produzione di alimenti fermentati)
1846 (Austria)	Primo processo per la produzione di lievito per panificazione
1864 (Francia)	Approvazione ufficiale dei risultati della ricerca di Louis Pasteur da parte della Accademia delle Scienze
1883 (Danimarca)	Primo processo di produzione di birra (Emil Hansen) con un ceppo di <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (oggi <i>Saccharomyces pastorianus</i>) in coltura pura
1915 (Inghilterra)	Primo processo in condizioni di sterilità per la produzione di acetone e butanolo da <i>Clostridium acetobutylicum</i> (Chaim Weizman)
1942 (Pfizer-USA)	Primo processo su larga scala per la produzione di penicillina
1973 (USA)	Publicazione del primo esperimento di DNA ricombinante (S.N. Cohen, A.G.Y. Chang, H.W. Boyer, R.B. Helling)
1978 (Lilly-USA)	Clonaggio del gene per l'insulina umana in <i>Escherichia coli</i>

Dopo questo periodo, l'ottenimento per via biologica di composti altrimenti ottenibili per via petrolchimica, ha conosciuto alterne vicende, in particolare in conseguenza delle oscillazioni del prezzo del petrolio. In generale, tuttavia, diversi fattori entrano in gioco nel definire i vantaggi delle produzioni biologiche rispetto all'uso di sistemi non biologici (tab. 17.2).

Un'altra tappa rilevante dell'evoluzione tecnico-scientifica dei processi di microbiologia industriale è quella rappresentata dalla produzione di acido citrico, prima fermentazione industriale in grado di utilizzare un fungo filamentoso (*Aspergillus niger*). I processi sopra descritti hanno costituito i presupposti per il formidabile sviluppo che, successivamente, ha coinvolto i differenti settori della microbiologia industriale, primo tra tutti la produzione di penicillina, la cui richiesta divenne drammaticamente urgente, anche questa volta in corrispondenza di un evento bellico. A partire da questa fase è stato possibile assistere a una continua e progressiva evoluzione delle tecnologie di processo, sia con riferimento alle dimensioni dei bioreattori e degli impianti, sia alle loro caratteristiche tecniche e ingegneristiche. L'ultimo sostanziale avanzamento della microbiologia industriale è segnato dal contributo apportato dall'**ingegneria genetica**, che rende possibile la produzione di **molecole eterologhe** da parte di microrganismi geneticamente modificati (MGM). Con l'inserimento di geni di origine umana o animale è possibile ottenere, come metaboliti microbici, molecole a elevato valore aggiunto impiegate in diagnostica e terapia. I primi prodotti sono stati l'insulina umana prodotta da *Escherichia coli* e gli anticorpi monoclonali. Ne sono seguiti rapidamente altri, quali interferone e l'ormone della crescita, fino ai più recenti sviluppi che hanno portato all'ottenimento di diverse classi di prodotti ad attività

Tabella 17.2 Vantaggi delle produzioni biologiche rispetto ai sistemi non biologici.

Condizioni operative blande (temperatura, pressione, pH)
Non sono richiesti metalli pesanti catalizzatori (potenzialmente inquinanti)
Possibilità di utilizzare una grande varietà di substrati
Possibilità di ottenere una grande varietà di prodotti
Possibilità di realizzare processi multistadio
Possibilità di realizzare reazioni uniche e stereospecifiche

biologica (vaccini, ormoni, farmaci immunomodulanti) o enzimatica (come la chimosina ricombinante per la caseificazione).

Una menzione a parte deve essere fatta per i processi di **biotrasformazione**, in cui il microrganismo produttore non si sviluppa, ma agisce da catalizzatore: questi processi sono stati inaugurati con la produzione di acido gluconico da parte di *Penicillium luteum purpurogenum*, processo che viene attualmente condotto utilizzando ceppi di *Aspergillus niger*. L'evoluzione dei processi di biotrasformazione è passata, in tempi relativamente recenti, dalla messa a punto di sistemi di immobilizzazione di enzimi a quella di cellule intere. Tuttavia questi sistemi, al momento, stentano a trovare diffusione su larga scala.

17.2 Microrganismi, substrati e prodotti della microbiologia industriale

A eccezione delle alghe, tutti i microrganismi attualmente usati in microbiologia industriale sono **eterotrofi**: batteri, lieviti o funghi filamentosi. I microrganismi di interesse industriale possono essere isolati da varie fonti: suolo, acque, ambienti naturali diversi, ma anche materie prime e prodotti alimentari (*vedi* par. 17.6). In alternativa, i microrganismi possono essere ottenuti da **Collezioni ufficiali di colture**, dove i ceppi microbici (oggetto di deposito brevettuale e non) sono conservati, eventualmente controllati, catalogati e distribuiti su richiesta (tab. 17.3).

Uno stesso prodotto può essere ottenuto utilizzando specie diverse appartenenti allo stesso genere, come nel caso dell'antibiotico novobiocina, prodotto sia da *Streptomyces niveus* sia da *Streptomyces spheroides*. D'altra parte, la produzione di un determinato metabolita può essere realizzata con processi che utilizzano microrganismi appartenenti a generi diversi, anche molto distanti tassonomicamente. È questo il caso della produzione di etanolo, realizzata con il lievito *Saccharomyces cerevisiae* o con il batterio *Zymomonas mobilis*. Infine, la stessa specie microbica può essere utilizzata in processi finalizzati all'ottenimento di metaboliti differenti, come nel caso di *Aspergillus niger*: ceppi diversi di questa specie possono essere impiegati come produttori di acido citrico o di acido gluconico, nonché di diversi tipi di enzimi.

Tabella 17.3 Le principali Collezioni di colture microbiche internazionali.

ATCC - American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
CABI - Bioscience Genetic Resource Collection (Egham, UK)
CBS - Centraal Bureau voor Schimmelcultures (Baarn, Olanda)
CCFC - Canadian Collection of Fungal Cultures (Ottawa, Canada)
CCM - Czechoslovak Collection of Microorganisms (Brno, Repubblica Ceca)
CCTM - Centre de Collection de Type Microbienne (Losanna, Svizzera)
CECT - Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spagna)
CIP - Collection de l'Institut Pasteur (Parigi, Francia)
CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (Parigi, Francia)
DBVPG - Dipartimento di Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroambientali (Perugia, Italia)
DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Germania)
IAM - Institute of Applied Microbiology (Tokyo, Giappone)
IFO - Institute for Fermentation (Osaka, Giappone)
JCM - Japan Collection of Microorganisms (Saitama, Giappone)
NCIB - National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria (Aberdeen, UK)
NCYC - National Collection of Yeast Cultures (Norwich, UK)
NRRL - Northern Regional Research Laboratory, US Dept. of Agriculture (Peoria, Ill., USA)

Le procedure di screening e di miglioramento genetico per la selezione di microrganismi iperproduttori sono da sempre alla base della scelta del microrganismo da utilizzare (*vedi* par. 17.6). Più recentemente, le tecniche classiche di selezione sono state sostituite/integrate da tecniche di DNA ricombinante grazie alle quali è possibile disporre di microrganismi geneticamente modificati in grado di esprimere le caratteristiche biotecnologiche desiderate (*vedi* Capitolo 11). Tuttavia, allo stato attuale l'impiego di questi microrganismi presenta una diffusione ancora limitata, per lo più al settore farmaceutico, a causa di due sostanziali limiti. Il primo è rappresentato dalle (indispensabili) restrizioni legislative che rendono molto complesso e costoso sia l'ottenimento della necessaria autorizzazione, sia il rispetto delle normative di sicurezza (che regolano, rispettivamente, l'uso confinato e il rilascio deliberato nell'ambiente dei MGM). A ciò, in particolari settori, segnatamente in quello alimentare, si aggiunge il secondo limite, rappresentato dallo scarso consenso esistente, da parte dell'opinione pubblica, sull'impiego dei MGM.

Qualunque sia il microrganismo produttore e il prodotto finale, nella messa a punto di un processo biotecnologico si dovrà in primo luogo rispondere all'esigenza di ottenere un'elevata resa in prodotto finale.

Esistono diversi coefficienti in grado di esprimere questo concetto. Quello più usato è il **coefficiente di resa o di rendimento ponderale**, indicato con il simbolo **Y** (*Yield* = resa o rendimento) e calcolato come:

$$Y = P/S$$

dove P è il prodotto formato (g) ed S il substrato consumato, usualmente la fonte di carbonio (g). Il rendimento (Y) teorico è espressione della capacità di un determinato substrato di sostenere lo sviluppo microbico (rendimento in biomassa), o la formazione di un determinato prodotto, nonché dell'efficienza del microrganismo nel trasformare quel dato substrato in biomassa cellulare o in uno specifico metabolita.

Altri indici dell'efficienza di un processo di produzione di biomassa o di metaboliti microbici sono: la **resa di fermentazione**, espressa in g (di cellule o prodotto)/l di brodocoltura, e la **produttività**, espressa in g (di cellule o prodotto)/l di brodocoltura prodotti nell'unità di tempo (ad esempio h).

La tabella 17.4 riporta un inquadramento di massima delle produzioni della microbiologia industriale e, dove applicabile, i valori (indicativi) dei coefficienti di resa, mentre per una più dettagliata classificazione dei metaboliti microbici si rimanda al paragrafo 17.3.

I coefficienti di resa dipendono, ovviamente, dal tipo di microrganismo. Nei processi industriali, tuttavia, le condizioni colturali e operative sono in grado di condizionare in maniera rilevante rese e produttività. Pertanto la formulazione del substrato dovrà tenere necessariamente conto di questo aspetto, nonché dell'influenza del substrato sugli aspetti tecnici ed economici del processo (tab. 17.5). In considerazione di quest'ultimo aspetto, è utile sottolineare che gli ingredienti dei substrati per uso industriale (principalmente le fonti di C e N) sono solitamente in forma grezza e rappresentano residui o sottoprodotti dell'industria agro-alimentare o, talvolta, surplus agricoli (tab. 17.6).

In conclusione, ogni processo di microbiologia industriale richiede necessariamente la **selezione** (o costruzione) di un ceppo iperproduttore e la messa a punto di un **substrato** con caratteristiche ottimali, specifiche per ogni ceppo produttore, per ogni prodotto e per ogni tipologia di processo. In merito, va sottolineato come, nei processi industriali, le condizioni colturali non debbano semplicemente rispondere alle esigenze nutrizionali del microrganismo, ma anche alle esigenze del processo, che, molto spesso, non sono coincidenti con quelle del

Tabella 17.4 Produzioni della microbiologia industriale.

Prodotto	Funzione
Cellule Y teorico ~0,5 con fonte di C zuccherina	Masse cellulari non vitali, definite <i>Single Cell Protein</i> o <i>Pluricellular Organism Protein</i> (SCP e POP), impiegate integralmente (dopo essiccazione), in funzione del contenuto proteico-vitaminico*
Resa di fermentazione 20-40 g/L (in peso secco cellulare)	Masse cellulari impiegate per l'estrazione di prodotti (generalmente per il settore alimentare o farmaceutico)* Cellule impiegate in funzione della loro attività in substrati complessi o ambienti particolari Cellule impiegate come mezzo di trasformazione di molecole specifiche (biotrasformazioni)
Metaboliti isolabili	Prodotti finali o intermedi del metabolismo energetico (fermentativo od ossidativo) Y ~0,5-0,9 Resa di fermentazione: 130-140 g/L (acido lattico); 40-60 g/L (lisina) Prodotti del metabolismo biosintetico (metaboliti primari o secondari) Non c'è correlazione diretta tra prodotto formato e substrato consumato Resa di fermentazione: 50 g/L (penicillina); alcuni mg (vitamina B12)
Prodotti complessi	Prodotti alimentari (alimenti e bevande fermentate)** I concetti di rendimento (Y) e di resa di fermentazione non sono applicabili
* Possono rappresentare un sottoprodotto di fermentazione (es.: micelio dall'industria degli antibiotici, lievito da produzione di birra).	
** Questi prodotti sono <i>border line</i> tra microbiologia industriale e microbiologia alimentare (tradizionalmente riferite alla prima disciplina sono le produzioni di birra e aceto).	

Tabella 17.5 Caratteristiche importanti dei substrati da utilizzare nelle fermentazioni industriali.

Alte rese di conversione e fermentazione
Costo limitato
Disponibilità sufficiente a coprire il fabbisogno
Facilità di trasporto e stoccaggio
Sterilizabilità (assenza di significative modificazioni dovute a denaturazione o altre reazioni collaterali)
Caratteristiche chimico-fisiche rispondenti ai fini del processo fermentativo (nei riflessi di aerazione, agitazione e controllo della schiuma)

Tabella 17.6 Alcuni substrati grezzi utilizzabili nelle fermentazioni industriali.

Fonti di carbonio	
Melasso	Sottoprodotto dell'estrazione dello zucchero da barbabietola e da canna
Hydrol	Acque madri dalla produzione di glucosio da amido di mais
Liscivio solfitico	Residuo della produzione della cellulosa da legname
Estratto di malto	Da orzo germinato
Siero di latte	Sottoprodotto della caseificazione
Fonti di azoto	
<i>Corn steep liquor</i> (acqua di macerazione)	Sottoprodotto dell'estrazione dell'amido di mais
Farina di semi di soia	Sottoprodotto dell'estrazione dell'olio con solventi
Borlande di distilleria	Residuo del processo di distillazione dell'alcol (da fermentazione di diversi zuccheri)

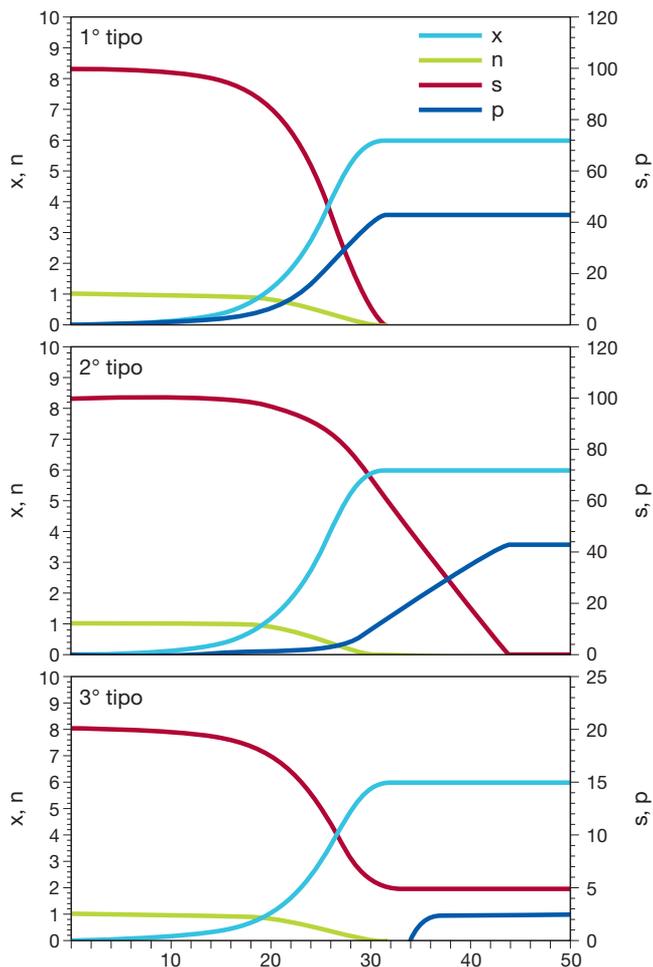
microrganismo: talvolta possono addirittura risultare, almeno in parte, in contrasto. Ciò deriva dal fatto che, spesso, il processo biotecnologico non ha la finalità di promuovere uno sviluppo armonico e bilanciato del microrganismo utilizzato, ma quella di favorire piuttosto il verificarsi di **condizioni non fisiologiche di accumulo di metaboliti** (vedi par. 17.5).

17.3 Classificazione dei metaboliti

In biochimica con il termine **fermentazione** ci si riferisce a un processo per la generazione di energia in cui i composti organici agiscono sia da accettori sia da donatori di elettroni. Si tratta di processi anaerobi (svolti senza l'intervento dell'ossigeno) i cui prodotti finali possono essere acidi, gas e/o alcoli. Da un punto di vista industriale una fermentazione è definita come la produzione di un qualsiasi prodotto del metabolismo mediante coltivazione massale di microrganismi. Molti processi industriali sono svolti in aerobiosi (il metabolismo aerobio è più efficace da un punto di vista energetico) e la varietà di prodotti ottenuti, e di conseguenza la varietà delle vie metaboliche necessarie per produrli, è enorme. Un modo semplice e diretto per classificare i prodotti delle fermentazioni industriali è dividerli in **metaboliti primari** e **secondari**. I primi sono direttamente legati ai processi biosintetici e catabolici del metabolismo centrale. Nella produzione di metaboliti primari crescita, consumo di substrato ed energia sono strettamente associati (fig. 17.2). Etanolo, acido lattico, ma anche alcuni aminoacidi sono prodotti primari, liberati nel mezzo a seguito delle cosiddette **fermentazioni del primo tipo**. Per alcuni prodotti del metabolismo primario (come l'acido citrico e l'acido fumarico), invece, la produzione è solo parzialmente associata alla crescita (fig. 17.2; **fermentazioni del secondo tipo**): a una prima fase di crescita (**trofofase**) in cui la produzione del bioprodotto è scarsa o nulla, segue una fase intermedia in cui la produzione inizia per poi raggiungere nella fase successiva (**idiofase**) la velocità massima, che è spesso proporzionale alla concentrazione di biomassa.

Figura 17.2
Rappresentazione schematica di cinetiche di fermentazioni.

Del primo tipo (produzione del prodotto associata alla crescita), del secondo tipo (produzione del prodotto parzialmente associata alla crescita), del terzo tipo (produzione del prodotto dissociata dalla crescita).
 x = concentrazione della biomassa;
 s = concentrazione della fonte di C;
 n = concentrazione della fonte di N;
 p = concentrazione del prodotto.



Mentre le vie del metabolismo centrale sono presenti, con poche differenze, in tutti gli esseri viventi, i **metaboliti secondari** derivano da vie metaboliche che non sono uniformemente diffuse, che non hanno una relazione diretta con la crescita e che spesso sono mal regolate. Nello specifico, la loro produzione è particolarmente diffusa nei microrganismi isolati da suolo e sedimenti, come batteri del genere *Bacillus*, attinomiceti e funghi filamentosi. La produzione di metaboliti secondari è dissociata dalla crescita e avviene durante la fase stazionaria, o idiofase (fig. 17.2: **fermentazioni del terzo tipo**). Sono metaboliti secondari gli antibiotici, molti pigmenti, gli alcaloidi ecc. Benché i blocchi di costruzione per la produzione di metaboliti secondari derivino dal metabolismo centrale, spesso le loro strutture sono inusuali (con anelli a 4 atomi, come l'acido penicillanico e gli altri antibiotici b-lattamici; con atomi di alogeni legati covalentemente al carbonio, come la clorotetraciclina, o di fosforo legati direttamente ad atomi di carbonio, come la fosfomicina; con aminoacidi atipici, come molti antibiotici peptidici). Alcune vie per la produzione di metaboliti secondari sono inoltre molto lunghe (ad esempio nella sintesi della tetraciclina, che richiede oltre 72 reazioni, solo alcune delle quali caratterizzate).

Infine, nelle **fermentazioni del quarto tipo**, i prodotti sono ottenuti per bio-trasformazione: la biomassa dei microrganismi viene utilizzata per catalizzare una o poche reazioni, come avviene nella produzione di cortisone o idrocortisone.

17.4 Sistemi di coltura e cinetica delle fermentazioni

Molte fermentazioni alimentari si svolgono ancora oggi in **stato solido**, con il microrganismo che cresce all'interno o sulla superficie di un materiale solido: substrato e microrganismo sono difficili da separare ed è difficile assicurare un apporto sufficiente di ossigeno.

Per alcune fermentazioni industriali (come la produzione di acido citrico), il substrato liquido viene disposto in vassoi poco profondi, con il microrganismo che cresce sul pelo del liquido e ottiene l'ossigeno direttamente dall'aria (atmosfera) (**fermentazioni in coltura superficiale**).

Le fermentazioni moderne si svolgono quasi esclusivamente in **substrati liquidi**, contenuti in recipienti chiamati fermentatori: dal momento che il microrganismo è sommerso nel substrato si parla di **fermentazioni in coltura sommersa**. Questa modalità di coltura consente un uso efficiente dello spazio e una facile manipolazione sia del substrato sia del brodo di fermentazione contenente il microrganismo e il prodotto, ma richiede un continuo apporto di ossigeno. Le fermentazioni in coltura sommersa possono essere condotte con tre modalità principali di alimentazione del substrato.

17.4.1 Coltura batch

I grafici riportati in figura 17.2 mostrano l'evoluzione nel tempo di biomassa (x), substrati (fonte di C, s , e di N, n) e prodotto (p) in tre tipi diversi di fermentazione: essi descrivono cioè la **cinetica del processo**. In tutti e tre i casi, tuttavia, la coltura inizia al tempo 0 con l'inoculo e prosegue senza aggiunte di substrato fino alla fine (mentre il volume rimane sostanzialmente costante). Questa è la modalità di coltura più semplice, la coltura batch. Il microrganismo attraversa tutte le fasi di sviluppo, la velocità di crescita è variabile e la concentrazione del/i substrato/i diminuisce continuamente mentre quella del prodotto aumenta. Mentre questa modalità di coltura ha il vantaggio della semplicità d'uso, essa presenta anche **numerosi vantaggi**:

- la velocità massima di crescita viene mantenuta soltanto per un intervallo limitato di tempo (fase esponenziale);
- concentrazioni elevate di fonte di carbonio possono avere effetti inibitori

o determinare diminuzioni della resa (come avviene per effetto Crabtree nei lieviti della specie *Saccharomyces cerevisiae*, vedi Capitolo 14);

- le dimensioni del fermentatore possono essere elevate, perché esso deve contenere tutto il substrato che si intende utilizzare;
- l'incidenza dei tempi morti (svuotamento, pulizia, riempimento) può essere notevole.

17.4.2 Coltura fed-batch (semicontinuo)

Benché, per la sua semplicità, la modalità di coltura batch sia la più diffusa, in alcuni tipi di fermentazione (ad esempio nella produzione di lievito per panificazione o nella produzione di penicillina) viene adottata la coltura in semicontinuo o fed-batch:

- in questo caso il fermentatore viene riempito solo parzialmente e inoculato al tempo 0;
- al tempo t inizia l'alimentazione di substrato fresco, che continua fino a quando non viene raggiunta la capacità massima del fermentatore;
- la velocità di crescita è variabile all'inizio ma può essere mantenuta costante se si adotta una regola di alimentazione del substrato appropriata durante il fed-batch;
- la concentrazione del substrato inizialmente diminuisce, ma può essere poi mantenuta costante durante la fase di alimentazione, mentre la concentrazione del prodotto generalmente aumenta.

I vantaggi principali di questa modalità di coltura sono:

- l'eliminazione delle inibizioni dovute a una concentrazione eccessiva di substrato (come nella produzione di biomassa di lievito per panificazione);
- il prolungamento della fase di produzione di metaboliti secondari (come nella produzione di penicillina).

Tuttavia la regola di alimentazione ottimale è spesso difficile da determinare. Come per le fermentazioni batch, il fermentatore può avere dimensioni elevate. Il processo viene interrotto quando l'accumulo di cataboliti rallenta il processo di produzione del metabolita di interesse.

17.4.3 Coltura in continuo

Nella coltura in continuo, dopo una fase batch, il fermentatore viene alimentato a velocità costante con il substrato. Allo stesso tempo, una quantità corrispondente di brodo colturale viene rimossa da uno scarico in modo da mantenere il volume costante. Dopo un certo tempo, la fermentazione raggiunge uno stato stazionario in cui la velocità di crescita e la concentrazione di substrato e prodotto sono costanti. I vantaggi della fermentazione in continuo sono gli stessi del fed-batch ma è possibile mantenere basse concentrazioni del substrato e concentrazioni relativamente elevate del prodotto durante tutta la fermentazione. Dal momento che la fermentazione può in teoria avere una durata indefinita fintanto che si alimenti il substrato, le dimensioni del fermentatore possono essere contenute, dal momento che il substrato "transita" nel fermentatore. Gli **svantaggi principali** delle fermentazioni in continuo sono la possibilità di contaminazione e di degenerazione della coltura e la difficoltà di raggiungere concentrazioni elevate per prodotti che causano un'inibizione dello sviluppo microbico. L'alimentazione del substrato nelle colture in continuo può essere:

- **a controllo esterno**, come nel **chemostato**, nel quale la velocità di crescita e la concentrazione di biomassa sono determinate dalla concentrazione del

substrato limitante e dal fattore di diluizione (il rapporto fra flusso di substrato e volume di liquido nel fermentatore);

- a **controllo interno**, come nel **turbidostato**, nel quale la velocità di alimentazione del substrato è regolata automaticamente sulla base della concentrazione della biomassa, determinata tramite la misura della torbidità della corrente di brodo colturale in uscita dal fermentatore.

Un tipo particolare di coltura continua è la **coltura multistadio**. In essa la corrente di brodo colturale in uscita da un fermentatore può costituire la corrente in ingresso in un altro fermentatore: in questi tipi di colture è possibile, a parità di flusso, creare condizioni diverse nei diversi fermentatori variando il volume del liquido.

17.4.4 Cinetica delle fermentazioni

Lo studio della cinetica delle fermentazioni è molto importante sia da un punto di vista scientifico sia da un punto di vista produttivo: i modelli matematici utilizzati per descrivere le relazioni fra le principali variabili di stato (biomassa, substrati, prodotti e sottoprodotti) con il tempo, fra di loro e con le condizioni di fermentazione possono essere utilizzati per ottimizzare i processi, massimizzando resa e/o produttività o per mettere a punto algoritmi di controllo dei processi. I modelli cinetici sono in genere sotto forma di sistemi di equazioni differenziali, spesso derivate per analogia da altri fenomeni chimici o fisici (*vedi* Capitolo 18).

17.5 L'accumulo di metaboliti di interesse industriale

I microrganismi sono fortemente influenzati dalle variazioni dell'ambiente in cui crescono, per cui la capacità di utilizzare un gran numero di sostanze nutritive e fonti di energia, attraverso un patrimonio enzimatico molto ricco, rappresenta un indubbio vantaggio selettivo. Questo vantaggio però rimane tale solo se accompagnato da sistemi di regolazione capaci di adeguare rapidamente la capacità metabolica alle esigenze ambientali (*vedi* Capitolo 16).

In natura, quindi, continuano a essere selezionati i microrganismi dotati dei sistemi di regolazione più fini ed efficienti. Lo sviluppo di un processo per la produzione di un metabolita di interesse industriale presenta invece esigenze diametralmente opposte, in quanto, in questo caso, si dovrà mettere a punto un sistema microrganismo-substrato-condizioni operative in grado di fornire un accumulo industrialmente rilevante del metabolita.

Occorre distinguere tra due classi di prodotti, per i quali l'accumulo ha significato sostanzialmente diverso. Nel **metabolismo anaerobico**, energeticamente meno favorevole, il prodotto finale si accumula man mano che lo sviluppo microbico procede, per effetto del trasferimento finale di H^+ ed elettroni all'accettore finale: se l'accettore è acido piruvico si accumulerà acido lattico (fermentazione lattica); se è acetaldeide si formerà etanolo (fermentazione alcolica) e così via. Il **metabolismo aerobio**, energeticamente più favorevole, in condizioni fisiologiche porta all'aumento ordinato di tutti i costituenti cellulari (con produzione di biomassa, CO_2 e H_2O), senza accumulo significativo di intermedi metabolici. L'ottenimento di accumuli di interesse industriale nel metabolismo ossidativo è subordinato a **due condizioni**:

- il terreno deve essere fortemente sbilanciato nella sua composizione;
- devono risultare alterati i normali meccanismi di regolazione del metabolismo microbico, attivi rispettivamente sulla sintesi degli enzimi – **induzione (e induzione sequenziale)** e **repressione feed-back**, – o sulla loro attività – **inibizione feed-back** (*vedi* anche Capitolo 16).

Se il microrganismo ha a disposizione tutte le sostanze nutritive necessarie, si accresce in modo regolare, con una composizione della biomassa pressoché costante e senza accumuli di rilevante entità. Nel momento in cui si verifica l'esaurimento di un componente essenziale per la crescita bilanciata, questa si arresta. Se il terreno fosse perfettamente bilanciato in tutti i suoi componenti, essi si esaurirebbero tutti insieme e tutte le attività metaboliche si arresterebbero in contemporanea. Questo in realtà non avviene in quanto nessun terreno colturale risulta perfettamente bilanciato nelle quantità dei suoi ingredienti (nemmeno quelli chimicamente definiti, da laboratorio). All'arresto della crescita si rendono quindi disponibili taluni **intermedi del metabolismo** che, generalmente, piuttosto che accumularsi come tali, sono trasformati dagli enzimi, presenti nella cellula, che continuano la loro attività. L'accumulo può essere di: **metaboliti primari** (molecole con un significato metabolico o una funzione ben definita) che si accumulano all'interno o all'esterno della cellula (quali acidi organici, aminoacidi, nucleotidi, vitamine, alcuni enzimi, peptidi, lipidi, polisaccaridi endocellulari); **metaboliti secondari** (per i quali non sempre è possibile individuare un significato metabolico o una funzione ben definita) che si accumulano generalmente all'esterno della cellula (quali antibiotici o altre molecole ad attività biologica: ormonale, immunomodulante, antitumorale ecc.). In entrambi i casi, la cinetica del processo risulta suddivisa in due fasi: una di sviluppo (**trofofase**) e una di accumulo del prodotto (**idiofase**) (vedi par. 17.3).

In un terreno fortemente sbilanciato, i fenomeni sopra descritti sono rilevanti. Tuttavia, affinché essi si traducano in un accumulo di metaboliti (primari o secondari) di interesse industriale, occorre che anche la seconda condizione sia soddisfatta, in quanto, in presenza di normali meccanismi di inibizione e repressione feed-back (**retroregolazione**), l'accumulo del metabolita andrebbe precocemente a bloccare la via metabolica che determina la sua formazione. In molti dei processi industriali in cui si ottengono accumuli metabolici rilevanti, questi sono il risultato di alterazioni dei suddetti meccanismi di regolazione. Nel paragrafo seguente ne vengono riportati alcuni esempi fra i più noti.

17.5.1 Strategie per l'ottenimento degli accumuli metabolici

Impiego di mutanti auxotrofi

Molti di questi mutanti presentano la caratteristica di fornire accumuli metabolici di molti aminoacidi (tab. 17.7), tra cui lisina, impiegata come integratore di molti alimenti per animali di interesse zootecnico. La **lisina** è il prodotto finale di una via metabolica ramificata che, a partire da acido aspartico, conduce anche alla sintesi di omoserina, metionina e treonina. Il primo enzima della via metabolica, l'aspartato chinasi, è sensibile a una retroregolazione concordata da parte di lisina + treonina che, in condizioni normali, impedisce ogni accumulo (fig. 17.3). Il problema è stato risolto selezionando mutanti di *Corynebacterium glutamicum* auxotrofi per omoserina (incapaci di sintetizzare l'enzima omoserina deidrogenasi

Tabella 17.7 Auxotrofie e resistenze ad analoghi di aminoacidi e accumulo di aminoacidi.

Auxotrofia	Aminoacido accumulato
Omoserina	Lisina: 44 g/L
Arginina	Ornitina: 26 g/L
Fenilalanina	Tirosina: 19 g/L
Fenilalanina e istidina	Leucina: 16 g/L
Resistenza	Aminoacido accumulato
Arginina idrossammato	Arginina: 20 g/L

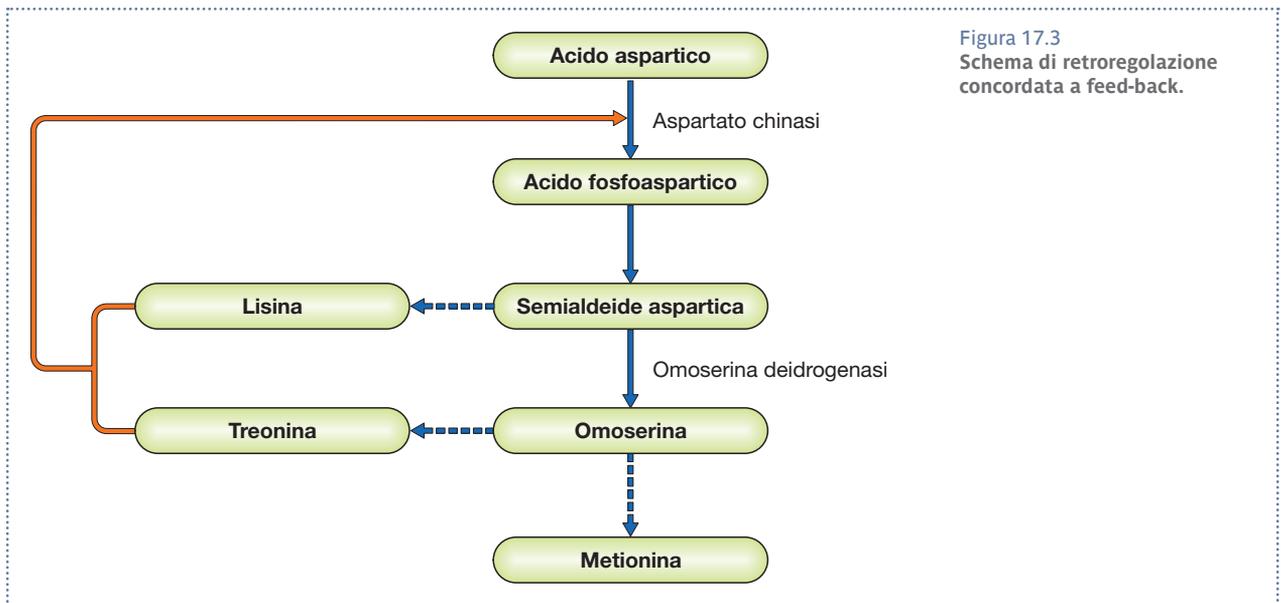


Figura 17.3
Schema di retroregolazione concordata a feed-back.

e, quindi, di produrre metionina e treonina). Se si forniscono a questi ceppi piccoli quantitativi di metionina e treonina nel substrato colturale, lo sviluppo può procedere e si ottengono accumuli sostanziali di lisina (fino a 40 g/L) in quanto la lisina, in assenza di eccesso di treonina, non ha effetto di retroregolazione.

Impiego di mutanti regolatori

Questi mutanti risultano insensibili alla retroregolazione feed-back (repressione e/o inibizione) e, comunque, possono essere facilmente riconosciuti utilizzando analoghi strutturali della molecola che esercita il controllo (i cosiddetti **antimetaboliti**). Se si aggiunge a un terreno colturale la S-(2-aminoetil)-L-cisteina (analogo strutturale della lisina), tutti i microrganismi in cui il sistema di regolazione descritto in figura 17.3 è funzionante non possono crescere, in quanto l'antimetabolita blocca, di concerto con la treonina, il passaggio catalizzato dall'aspartato chinasi, determinando una carenza dei relativi aminoacidi e blocco della sintesi proteica. Gli unici microrganismi che riescono a crescere sono i mutanti insensibili alla retroregolazione da parte dell'antimetabolita, che pertanto lo saranno anche nei confronti della lisina. Con questa procedura è stato selezionato un mutante regolatore di *Brevibacterium flavum* in grado di accumulare fino a 57 g/L di lisina.

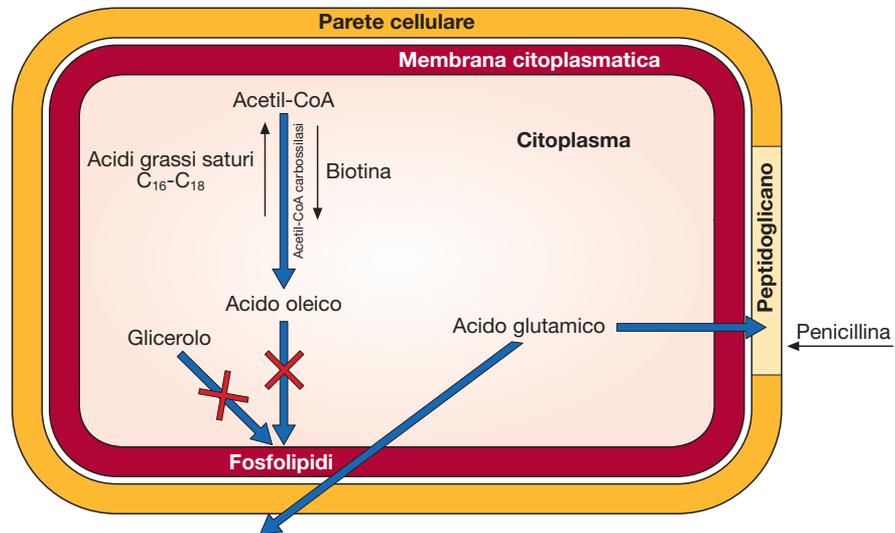
Impiego di mutanti insensibili alla repressione da cataboliti o effetto glucosio

Molti di questi mutanti sembrano essere modificati nelle vie cataboliche del glucosio, che utilizzano lentamente, mantenendo alti livelli intracellulari di AMP-ciclico. Ciò determina il risultato che tutta una serie di enzimi (del metabolismo primario o secondario), normalmente repressi, sono invece sintetizzati. In altri mutanti, la mancata repressione da cataboliti è legata a mutazione dello specifico enzima oggetto della repressione. Una strategia alternativa per aggirare l'effetto glucosio consiste nell'adottare modalità di rifornimento graduale (fed-batch) della fonte di C, in grado di mantenere la sua concentrazione sempre al di sotto della concentrazione inibente (vedi par. 17.4).

Altre strategie

È possibile aggirare i meccanismi di controllo feed-back anche favorendo l'eliminazione del prodotto finale che esercita il controllo, mediante modificazione della

Figura 17.4
Schemi di alterazione della
sintesi dei fosfolipidi di
membrana.



permeabilità della membrana cellulare. Questo meccanismo è utilizzato nel caso di *Corynebacterium glutamicum*, iperproduttore di acido glutamico. I ceppi produttori di questo aminoacido sono incapaci di trasformare l'acido α -chetoglutamico in succinico (inibizione della α -chetoglutarato deidrogenasi) e ne operano l'aminazione in acido glutamico (L-glutamato deidrogenasi attivata). Questo aminoacido esercita però una retroregolazione feed-back che ne impedisce un accumulo rilevante. L'ostacolo può essere rimosso alterando la permeabilità della membrana cellulare all'acido glutamico, che in tal modo viene rapidamente espulso dalla cellula e non esercita più la retroregolazione. A tal fine possono essere messe in atto diverse strategie in grado di **inibire la sintesi dei fosfolipidi di membrana** (fig. 17.4): crescita del ceppo produttore (auxotrofo per biotina) in substrato carente di questa vitamina (< 5 g/L), oppure crescita del ceppo produttore in substrato arricchito in acidi grassi saturi C_{16} - C_{18} (anche in presenza di biotina); questa seconda ipotesi è attuabile negli impianti produttivi in cui sono normalmente utilizzati melassi (ricchi di biotina).

In alternativa, la permeabilità della membrana può essere aumentata (anche in presenza di biotina) aggiungendo alla brodocoltura livelli sub-inibitori di penicillina, che agisce sulla struttura del peptidoglicano di parete e sulla sua funzione protettiva nei confronti della membrana.

17.6 Procedure per la selezione di microrganismi di interesse industriale

Con il termine **screening** si definisce una procedura rivolta alla valutazione di microrganismi in base a una caratteristica di interesse industriale (ad esempio la produzione di una nuova molecola o di elevate concentrazioni di molecole già note). Con il termine **selezione**, invece, si intende il risultato ottenuto tramite la procedura di screening, cioè la scelta di ceppi in grado di esprimere al meglio le caratteristiche desiderate. In entrambi i casi, lo scopo finale è rappresentato dall'ottenimento di un nuovo prodotto, dalla messa a punto di un nuovo processo, dalla modifica innovativa di un processo già esistente o da una combinazione delle condizioni precedenti.

Dopo la fase di screening/selezione dei ceppi (che comporta una serie di ricerche condotte in successione), lo sviluppo di un processo include la caratterizzazione del prodotto ottenuto, la messa a punto delle condizioni di fermentazione

Tabella 17.8 Fasi di una procedura di ricerca e sviluppo per l'ottenimento di nuove molecole.

Fasi	Procedure
A) Screening primario	A1) Isolamento dei microrganismi A2) Saggi di attività (in terreni solidi o liquidi) A3) Caratterizzazione del microrganismo produttore A4) Eventuale deposito brevettuale del microrganismo e/o del processo
B) Screening secondario	B1) Selezione diretta dei microrganismi B2) Miglioramento genetico e selezione dei microrganismi B3) Ottimizzazione e modellizzazione delle condizioni di coltura
C) Isolamento e caratterizzazione dei metaboliti prodotti	C1) Estrazione e purificazione dei metaboliti microbici C2) Caratterizzazione chimico-fisica dei metaboliti prodotti C3) Caratterizzazione dell'attività biologica dei metaboliti prodotti C4) Eventuali prove di citotossicità dei metaboliti prodotti

più idonee e il passaggio dalla scala di laboratorio a quella industriale. L'effettiva applicabilità del processo alla scala industriale può, in alcuni casi, essere definita solo nelle fasi conclusive, in seguito all'isolamento e alla caratterizzazione delle molecole prodotte.

Un **programma di ricerca e sviluppo** prevede pertanto più fasi, in genere strettamente interconnesse. La prima fase, di tipo principalmente microbiologico, prevede l'esecuzione degli screening, la selezione dei ceppi e le prove preliminari in scala di laboratorio. Quella successiva prevede l'estrazione, la purificazione e la caratterizzazione chimico-fisica e biologica delle molecole isolate. Tutto ciò può essere riassunto nella seguente procedura:

- **screening primario**, finalizzato all'isolamento e alla caratterizzazione dei ceppi produttori;
- **screening secondario**, finalizzato alla selezione dei ceppi e al miglioramento di un processo.

In tabella 17.8 sono riportate le fasi principali di una procedura di ricerca e sviluppo finalizzata all'ottenimento di nuove molecole ad attività biologica.

17.6.1 Screening primario

Lo screening primario si compone di diverse fasi, alcune sequenziali, altre in parallelo tra di loro. In questo contesto, le procedure di screening utilizzate consentono in genere l'eliminazione, già a partire dalle prime fasi, di molti ceppi (caratterizzati dall'assenza o da un basso livello di espressione dell'attività considerata). In questa fase vengono presi in considerazione una serie di fattori, quali:

- procedure di isolamento dei microrganismi produttori;
- scelta di idonei saggi da impiegare per evidenziare l'attività ricercata (figg. 17.5-17.8);
- scelta dei metodi per il miglioramento di tale attività.

Isolamento dei microrganismi

In alternativa alle collezioni di colture microbiche, i microrganismi possono essere isolati a partire da differenti habitat (suolo, materiale vegetale, prodotti alimentari ecc.) che, in funzione delle proprie caratteristiche fisico-chimiche, possono condizionare il tipo di microrganismi isolabili. Ad esempio, i batteri lattici possono essere facilmente isolati a partire da prodotti lattiero-caseari, da prodotti carnei o da foraggi fermentati; i lieviti vengono frequentemente isolati da ambienti ricchi di zuccheri (mosti in fermentazione, essudati zuccherini ecc.), mentre i funghi filamentosi rappresentano la comunità microbica predominante di habitat a rea-

Figura 17.5
Screening di batteri lattici per la produzione di batteriocine.

I ceppi di batteri lattici vengono inoculati in forma di *spot* sulla superficie di adatto substrato nutritivo e incubati. Le cellule vengono uccise mediante esposizione a vapori di cloroformio. Un secondo strato di agar contenente un numero elevato di cellule di microrganismo indicatore, verso il quale si intende valutare l'attività inibitoria, viene versato sulla superficie del primo strato. Dopo incubazione, le colonie di batteri lattici in grado di produrre batteriocine (sostanze inibitorie di natura proteica) saranno circondate da una zona (alone) di inibizione dello sviluppo del microrganismo indicatore.



Figura 17.6
Screening di batteri lattici per la produzione di composti ad azione antifungina.

I ceppi da testare (LD 36; LD38, LD39; LD40) vengono inoculati in forma di *spot* sulla superficie di adatto substrato nutritivo e incubati. Un secondo strato di agar, inoculato con 10^5 conidi/ml del microfungo (muffa)-indicatore, viene versato sulla superficie del primo strato. Dopo incubazione, le colonie dei ceppi produttori di composti ad attività antifungina (LD40) saranno circondate da una zona (alone) di inibizione dello sviluppo del microrganismo indicatore.

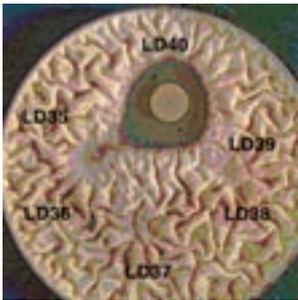


Figura 17.7
Screening di batteri lattici per la produzione di destrano.

I ceppi da testare (LD35-LD42) vengono inoculati in forma di *spot* sulla superficie di adatto mezzo nutritivo contenente saccarosio e incubati. Le colonie dei ceppi produttori di destrano risulteranno di grandi dimensioni e di evidente aspetto mucide (LD37; LD40).



zione tendenzialmente acida. È interessante inoltre sottolineare che alcuni habitat possono ospitare un'elevata frequenza di ceppi in grado di esprimere particolari attività (ad esempio microrganismi isolati da suoli inquinati da impianti industriali in grado di degradare molecole organiche aromatiche).

Le colture microbiche isolate sono quindi sottoposte a saggi per mettere in evidenza le proprietà ricercate (ad esempio produzione di antibiotici, enzimi, polisaccaridi, vitamine ecc.). Un fattore critico per la scelta di saggi idonei all'esecuzione degli screening è rappresentato dalla **localizzazione extracellulare o intracellulare del metabolita prodotto**. Nel primo caso la procedura sarà assai più semplice rispetto al secondo, nel quale sarà necessario procedere alla rottura delle cellule e al successivo recupero della molecola prodotta.

Saggi di attività

I saggi di attività possono essere:

- saggi condotti **in terreno solido**, che forniscono risultati prevalentemente di tipo qualitativo o semi-quantitativo;
- saggi condotti **in terreno liquido**, che forniscono in genere risultati di tipo quantitativo.

Nel primo caso l'attività ricercata viene messa in evidenza, per lo più, dalla **presenza di aloni attorno alle colonie** (vedi figg. 17.5 e 17.6). Questi sono provocati dalla produzione da parte delle cellule microbiche della molecola desiderata, che, diffondendo nel terreno di coltura, provoca un caratteristico alone (ad esempio alone di inibizione della crescita di microrganismi target nel caso di produzione di antibiotici, alone di chiarificazione/colorazione nel caso di produzione di particolari enzimi extracellulari ecc.).

Nel secondo caso, dopo la crescita dei microrganismi in terreno di coltura liquido e allontanamento delle cellule, i saggi sulla presenza di attività possono essere **condotti direttamente sulla fase liquida** (surnatante). Il tipo di saggio impiegato dipende dal tipo di molecola ricercata. Ad esempio, la produzione di antibiotici può essere messa in evidenza in questa fase tramite saggi di inibizione: la presenza di attività antimicrobica osservata nel surnatante costituirà una prova della presenza in esso di antibiotici prodotti dai microrganismi. In alternativa, la messa in evidenza di altre molecole (ad esempio enzimi, acidi organici) può essere condotta tramite saggi colorimetrici, cromogenici, fluorimetrici ecc. eseguiti direttamente sul surnatante.

15.6.2 Screening secondario

Agendo sulle condizioni colturali, sul microrganismo produttore, o su entrambi, lo screening secondario rappresenta un passaggio preliminare alle successive fasi di trasferimento del processo dalla scala di laboratorio a quella industriale. Si compone di una serie di fasi in sequenza e/o in parallelo tra loro.

Selezione di ceppi iperproduttori

Sebbene la selezione diretta di microrganismi iperproduttori abbia in passato permesso un sensibile miglioramento della produttività di alcuni processi (ad esempio la produzione di antibiotici da attinomiceti e da funghi filamentosi, quella di etanolo da parte di lieviti), la bassa frequenza con cui alcuni caratteri vengono espressi all'interno di una popolazione microbica determina il fatto che oggi **tale procedimento viene considerato poco redditizio**. È pertanto considerato preferibile migliorare le caratteristiche metaboliche dei microrganismi tramite uso di agenti mutageni (fisici o chimici) o di tecniche di manipolazione genetica.



Figura 17.8

Pick-test.

La produzione di esopolisaccaridi può essere verificata utilizzando una semplice ansa, che, al contatto con la colonia (mucoide) del ceppo produttore, sviluppa un evidente filamento viscoso.

Impiego di tecniche di mutazione

La messa a punto di nuove tecniche di mutazione ha permesso talvolta di ottenere **considerevoli miglioramenti delle produttività**: per alcune molecole (ad esempio antibiotici) il livello di produzione ottenuto utilizzando ceppi mutanti selezionati appare circa 500 volte superiore alle produzioni osservabili alcuni decenni fa (vedi par. 17.10). L'uso di queste tecniche determina modificazioni **a livello dei cromosomi** (alterazione del numero di cromosomi o della sequenza dei geni) **o dei geni** (alterazione della sequenza di basi).

Tra gli agenti mutageni più impiegati è possibile citare:

- **agenti mutageni di tipo fisico**: ad esempio radiazioni di tipo ionizzante (raggi X e γ) o non ionizzante (raggi UV);
- **agenti mutageni di tipo chimico**, classificabili sulla base del meccanismo di azione: composti che interferiscono a livello di replicazione del DNA e composti che agiscono in maniera differente. Tra i primi è possibile citare molecole analoghe alle basi (5-bromouracile, 2-aminopurina ecc.) e le acridine (arancio di acridina, bromuro di etidio ecc.); tra i secondi l'acido nitroso e gli agenti alchilanti (etilmetanosulfonato, nitroso guanidina, dietil solfato ecc.) (vedi Capitolo 12).

È importante tuttavia ricordare che, poiché un trattamento mutageno causa **eventi casuali**, ciò non implica necessariamente che tutte le cellule siano mutate e soprattutto che le mutazioni, dove avvenute, possano essere considerate comunque positive ai fini del miglioramento dei ceppi. In altre parole, poiché il solo fatto di indurre mutazioni nei ceppi non fornisce alcuna sicurezza che tra i mutanti siano presenti ceppi di maggior interesse rispetto ai ceppi di partenza, un programma di miglioramento dovrà essere costituito da una sequenza di questo tipo: **trattamento mutageno** ° **selezione dei mutanti ottenuti** ° **ulteriore trattamento mutageno** ° **ulteriore selezione ecc.**

Selezione dei mutanti

Indipendentemente dalle tecniche di mutazione utilizzate, la successiva fase di se-

lezione costituisce un **punto critico nella strategia di miglioramento dei ceppi**. Può essere realizzata secondo due criteri fondamentali:

- **selezione casuale** dei ceppi sopravvissuti al trattamento mutageno;
- **isolamento selettivo** in condizioni adatte a evidenziare (in maniera indiretta) l'insorgenza di mutazioni favorevoli.

Nel primo caso si tratta in genere di una procedura laboriosa e costosa, sebbene rappresenti talvolta una via obbligata per ottenere mutanti a elevata produttività. Nel secondo caso sono state sviluppate procedure che consentono di evidenziare ceppi mutati in senso favorevole già a partire dalle prime fasi della ricerca. Tutto ciò a causa dell'associazione esistente tra alcuni caratteri fisiologici espressi da ceppi mutati e l'induzione di modificazioni nei sistemi di regolazione metabolica che consentono di ottenere mutanti iperproduttori. Tra questi è possibile citare la **resistenza agli antibiotici** (isolamento di ceppi resistenti a elevate concentrazioni dell'antibiotico da essi stessi prodotto), l'**auxotrofia** (mutanti caratterizzati da modificazioni dei sistemi di regolazione metabolica, incapaci di svilupparsi su alcuni terreni minimi) e la **resistenza agli antimetaboliti** (carattere considerato associato a un elevato livello di produzione del corrispondente metabolita).

Tecniche di manipolazione genetica

Queste possono essere così suddivise:

- tecniche di ricombinazione naturale;
- ingegneria genetica.

Mentre le **tecniche di ricombinazione naturale** (utilizzate in passato soprattutto per il miglioramento di ceppi di lievito da destinare alla panificazione) rivestono ormai quasi esclusivamente un'importanza di tipo storico, l'utilizzazione dell'**ingegneria genetica** offre infinite opportunità per ottenere **nuove combinazioni di geni per l'espressione di caratteri di interesse industriale**. La tecnologia del DNA ricombinante consente infatti di **clonare** una specifica sequenza di DNA (proveniente da un organismo donatore) in un idoneo **vettore** che viene introdotto nella cellula ospite per provvedere all'**espressione del carattere** legato alla produzione del composto.

L'impiego di queste procedure non dipende tuttavia soltanto dalla possibilità di clonare geni in opportuni microrganismi ospiti, ma anche dalla possibilità di incrementare il livello di espressione dei caratteri introdotti allo scopo di ottenere elevate concentrazioni di molecole di interesse industriale. A tal fine, l'ospite deve possedere idonee caratteristiche:

- capacità di crescere rapidamente;
- assenza di virulenza nei confronti dell'uomo, degli animali e dei vegetali;
- stabilità genica;
- capacità di replicazione del vettore.

I microrganismi riceventi più utilizzati per il clonaggio sono batteri (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) e in particolare lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces marxianus*).

In tabella 17.9 sono riportati alcuni esempi di proteine ottenute da lieviti ospiti tramite ingegneria genetica.

Miglioramento delle condizioni di coltura

Questa fase, parallela a quelle sopra riportate, prevede la messa a punto delle **mi-**

Tabella 17.9 Esempi di proteine ottenute da lieviti ospiti tramite ingegneria genetica.

Origine del DNA	Proteina prodotta	Lievito ospite
Virus		
Virus Epatite B	Polimerasi	<i>Pichia metanolica</i>
Archea		
<i>Pyrococcus furiosus</i>	β -Glucosidasi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Batteri		
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	β -Glucosidasi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	β -1,4-Xilanasasi	
Protozoi		
<i>Plasmodium falciparum</i>	Antigene della malaria	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Piante		
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	α -Galactosidasi	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Uomo		
	α -Galactosidasi A Antigene epatite B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

gliori condizioni culturali per il processo in via di sviluppo. In questo contesto, la valutazione dell'influenza dei singoli parametri sull'attività metabolica costituisce un punto fondamentale per lo sviluppo di un processo. La formulazione del terreno di coltura, nonché l'ottimizzazione dei parametri chimico-fisici del processo (ad esempio pH, temperatura, grado di aerazione ecc.) appaiono infatti in grado di indirizzare il metabolismo microbico verso l'accumulo delle molecole desiderate (*vedi* anche par. 17.5).

17.7 I fermentatori

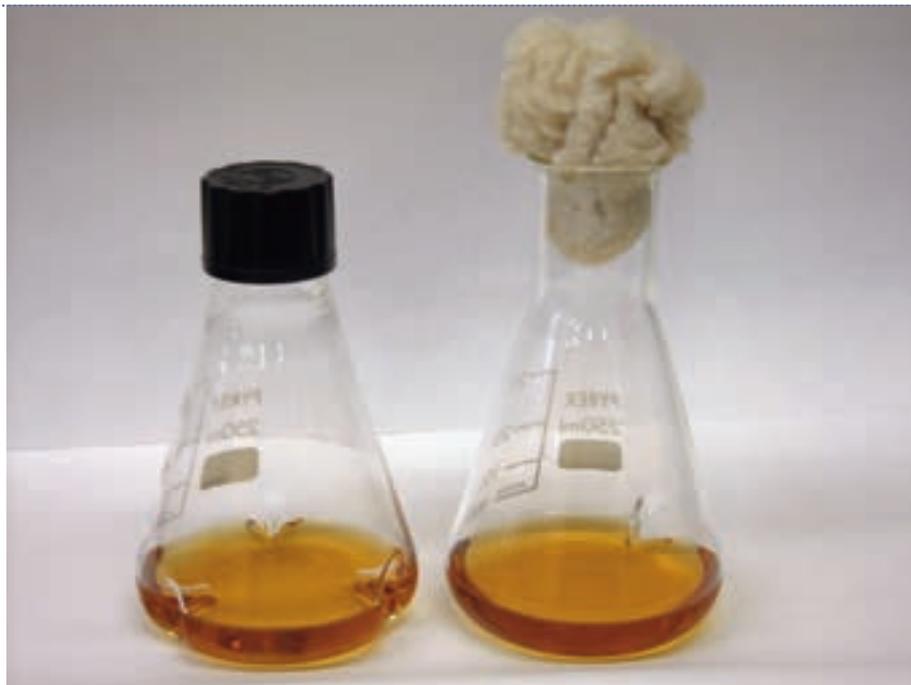
Vengono definiti “fermentatori” i contenitori nei quali avviene il processo metabolico desiderato, indipendentemente dal fatto che sia una fermentazione o un processo respiratorio aerobico o anaerobico. Le fermentazioni più tradizionali si svolgono in semplici tini o vasche (quelle anaerobiche come la produzione di birra o vino), o in percolatori di legno o metallo (quelle aerobiche, come la produzione di aceto). Tutti questi recipienti sono caratterizzati da limitati sistemi per la misura e il controllo della temperatura e sono privi di sistemi e attrezzature in grado di prevenire la contaminazione. I **moderni fermentatori**, a partire dalla scala di laboratorio (2-40 l) fino a quella industriale (1-200 m³ e oltre), sono invece sistemi complessi in grado di operare in modo asettico. Essi sono costruiti in vetro e acciaio (**fermentatori da laboratorio**) o in acciaio (**fermentatori pilota e industriali**) e possono permettere la misura e il controllo di tutti i parametri fondamentali per la conduzione del processo fermentativo (temperatura, pH, concentrazione di ossigeno disciolto, schiuma o livello ecc.).

Come indicato nel paragrafo 17.4, le fermentazioni moderne avvengono in genere in coltura sommersa. Nei fermentatori deve quindi essere possibile garantire **agitazione** e, generalmente, **aerazione**. L'agitazione è necessaria per mantenere in condizioni omogenee il brodo di coltura e permettere lo scambio di energia necessario per mantenere costante la temperatura del fermentatore. Come ricordato nel paragrafo 17.4, la maggior parte delle trasformazioni industriali sono processi aerobi. L'ossigeno è poco solubile nei substrati per fermentazioni (in soluzioni acquose la concentrazione di ossigeno nella fase liquida in equilibrio con la concentrazione presente nell'aria è di appena 7,5 mg/L). Per mantenere la sua concentrazione a livelli accettabili per la crescita di microrganismi aerobi, che lo consumano rapidamente con la respirazione, è necessario fornirlo in continuazione mediante l'aerazione (le concentrazioni di ossigeno disciolto al di sotto delle quali la velocità di crescita di *Escherichia coli* e *Penicillium chrysogenum* comincia a rallentare significativamente sono rispettivamente 0,256 e 0,704 mg/L).

Il più semplice fermentatore da laboratorio è la **beuta agitata** (*shaken flask*):

Figura 17.9
Beute con frangiflutti per la coltura aerobia dei microrganismi.

I frangiflutti (visibili come sporgenze all'interno della beuta) migliorano la turbolenza e, quindi, il trasferimento dell'ossigeno, durante l'agitazione delle beute.



si tratta di recipienti troncoconici, riempiti solo parzialmente (generalmente per non più di un quinto) con il substrato di fermentazione. Questi vengono inoculati e incubati su **shaker orbitali** che impongono un movimento rotatorio al liquido. Il rimescolamento viene migliorato da uno o più frangiflutti (piccole pale ricavate nella parete del recipiente) (fig. 17.9). Gli shaker orbitali vengono posti in **incubatori** di varie dimensioni per il controllo della temperatura. Le beute hanno dimensioni relativamente ridotte (il volume di substrato utilizzabile varia da 10 a 500 mL) e di fatto consentono soltanto di condurre fermentazioni in batch con un controllo della temperatura (che è praticamente l'unico fattore che può essere mantenuto costante) e, parzialmente, dell'areazione (che può essere aumentata aumentando la velocità di agitazione). Tuttavia, le beute agitate sono un sistema di fermentazione poco costoso, che consente di eseguire un gran numero di prove contemporaneamente e sono per questo utilizzate nelle fasi iniziali della messa a punto di processi fermentativi o in attività di screening.

Forme, dimensioni e funzionalità dei fermentatori da laboratorio, pilota e industriali sono molto varie, benché tutti debbano garantire un funzionamento asettico e la possibilità di mantenere le condizioni ambientali ideali per il processo fermentativo. La classificazione dei fermentatori è basata soprattutto sulle modalità con le quali vengono garantite aerazione e agitazione.

17.7.1 Fermentatori ad agitazione meccanica

Nei fermentatori ad agitazione meccanica (figg. 17.10 e 17.11a), generalmente a forma di tino, caratterizzati da un rapporto fra diametro e altezza (**rapporto di snellezza**) compreso tra 1 e 4, l'areazione viene garantita mediante l'immissione di aria compressa sterile attraverso un distributore (*sparger*) tubolare, forato o poroso, mentre l'agitazione è garantita da turbine azionate da un motore posto in testa o alla base del fermentatore. Oltre a garantire il corretto rimescolamento, l'azione delle turbine contribuisce notevolmente anche all'areazione, riducendo il diametro delle bolle d'aria immesse nel fermentatore e migliorando lo scambio di ossigeno. Per migliorare l'agitazione il fermentatore contiene inoltre elementi statici, i frangiflutti, che impediscono la formazione di vortici. Altri elementi fondamentali sono:



Figura 17.10
Un fermentatore da laboratorio ad agitazione meccanica.

- scambiatori di calore necessari per il controllo della temperatura durante la sterilizzazione o durante il funzionamento del fermentatore, costituiti da camicie nelle quali circola acqua fredda, calda o vapore, o, nei fermentatori più grandi, da serpentine o scambiatori di calore esterni;
- sistemi per il campionamento asettico;
- sistemi per l'aggiunta di acidi, basi, antischiuma o substrati.

17.7.2 Fermentatori ad agitazione pneumatica

Sono generalmente costituiti da recipienti cilindrici, con rapporto di snellezza compreso tra 6 e 12, sormontati da una sezione con diametro maggiore (fig. 15.11b), necessaria per garantire la separazione fra gas e liquidi; l'agitazione e l'aerazione sono entrambe garantite dall'aria compressa sterile immessa tramite uno sparger. Per garantire un migliore trasferimento di ossigeno in queste tipologie di fermentatori, costruttivamente più semplici e più economici, sono spesso necessarie:

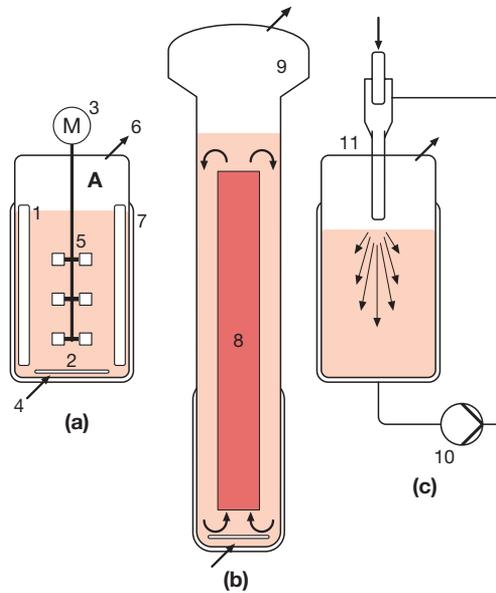
- portate di aerazione maggiori (1-2 volumi di aria per volume di liquido per minuto, vvm, contro 0,4-1 vvm nei fermentatori ad agitazione meccanica);
- maggiori pressioni per aumentare la solubilità dell'ossigeno (incremento della pressione idrostatica, legata all'altezza spesso notevole, > 50 m, dei fermentatori a colonna ma anche al mantenimento di una notevole pressione nell'atmosfera in testa al fermentatore, > 0,4 MPa);
- elementi statici (colonne di ricircolazione, piatti forati) per migliorare la turbolenza e quindi lo scambio di ossigeno.

17.7.3 Fermentatori ad agitazione idraulica

In questi fermentatori, che hanno una geometria estremamente variabile (a tino, a colonna, tubolari), l'agitazione è determinata dall'energia cinetica del brodo di fermentazione messo in circolo tramite una pompa (generalmente centrifuga), mentre l'aerazione è garantita da ugelli a flusso bifasico (gas-liquido) che garantiscono un fine mescolamento delle correnti liquida e gassosa, favorendo l'aerazione (fig. 17.11c). Gli ugelli possono essere:

Figura 17.11
Rappresentazione
schematica di diversi
fermentatori.

(a) Ad agitazione meccanica;
 (b) ad agitazione
 pneumatica; (c) ad agitazione
 idraulica. 1. frangiflutti; 2.
 sparger; 3. motore; 4. aria in
 ingresso; 5. asse con turbine;
 6. aria in uscita; 7. camicia
 per la circolazione di liquidi
 per il riscaldamento e il
 raffreddamento; 8. tubo per
 la circolazione interna;
 9. separatore di schiuma;
 10. pompa centrifuga per il
 ricircolo del substrato;
 11. ugello eiettore.



- eiettori (che aspirano l'aria);
- iniettori (che immettono aria compressa nella corrente di liquido che passa nell'ugello);
- a getto libero di liquido.

Il vantaggio principale di questo tipo di fermentatori è l'economicità di gestione (i costi di funzionamento e manutenzione delle pompe centrifughe sono inferiori a quelli dei compressori), accoppiata a una buona capacità di trasferimento dell'ossigeno.

17.7.4 Altri tipi di fermentatori

Come riportato nel paragrafo 17.4, ai fermentatori per colture sommerse si aggiungono numerosi tipi di fermentatori adatti a colture superficiali (spesso costituiti semplicemente da serie di vassoi di acciaio impilati in camere di fermentazione) o per colture immobilizzate o in stato solido (letti impaccati, letti percolatori, fermentatori a letto fluidizzato ecc.).

17.7.5 Controllo dei parametri di fermentazione

Per garantire le produzioni ottimali di biomassa o di determinati prodotti è necessario mantenere sotto controllo una serie di parametri di natura fisico-chimica. Il controllo di tali parametri nei moderni fermentatori è completamente automatizzato (tab. 17.10). I componenti di una catena di controllo sono costituiti da:

- **sistema di misura**, costituiti da sensori che, a seguito della variazione di un parametro, producono una risposta generalmente di natura elettrica (ad esempio variazione di voltaggio negli elettrodi per il pH o nelle termocoppie, variazione di resistenza nei termometri a termoresistenza) che viene trasformata in un segnale leggibile mediante idonei sistemi elettronici, comprendenti cavi di collegamento, amplificatori, trasduttori e sistemi indicatori;
- **elementi di controllo**, in cui il segnale del sensore viene confrontato con il valore che si desidera mantenere (*set-point*) e che producono a loro volta un segnale che aziona degli attuatori, che intervengono sul sistema per riportare il valore della variabile misurata verso il *set-point*.

Tabella 17.10 Misura e controllo di bioparametri nelle fermentazioni industriali.

Bioparametro	Tipo di misura	Tipo di sensore	Controllo
Fisici			
Velocità di agitazione	On-line	Tachimetro	Variazione della corrente di alimentazione
Temperatura	In-line	Termometri a termoresistenza, termistori	Attivazione di elettrovalvole per circolazione di fluidi caldi e freddi in scambiatori di calore
Pressione sul pelo liquido	In-line	Manometri	Elettrovalvole
Livello	In-line	Sonde a conduttività	Pompe, elettrovalvole
Peso	On-line	Celle di carico	Pompe, elettrovalvole
Portate di liquidi o gas	On-line	Misuratori di portata di massa	Elettrovalvole, pompe
Chimici e chimico-fisici			
pH	In-line	Elettrodi combinati	Aggiunta di acidi o alcali
Concentrazione di ossigeno disciolto	In-line	Elettrodi polarografici	Controllo di velocità di agitazione, composizione e portata gas, pressione
Concentrazione di CO ₂ nel substrato	In-line	Elettrodi combinati	
Concentrazione di CO ₂ nel gas effluente	On-line	Analizzatori all'infrarosso	Controllo portata del substrato
Concentrazione di O ₂ nel gas effluente	On-line	Analizzatori paramagnetici, elettrodi polarografici	Controllo portata del substrato
Concentrazione substrati	On-line	Biosensori, elettrodi selettivi	Controllo portata di substrati
Biologici			
Biomassa	On-line, off-line	Spettrofotometri, turbidimetri	Controllo del tasso di alimentazione e della concentrazione di substrato
Prodotti nel substrato o nei gas effluenti	On-line, off-line	Spettrofotometri, HPLC, GLC, spettrometri di massa	Vari
Composizione della biomassa	Off-line	Vari	Vari

La tabella 17.10 riporta i principali parametri e i relativi sistemi di misura e controllo. Alcuni parametri devono essere misurati in continuo, all'interno del fermentatore. Questa modalità di misura, detta **in-line**, richiede sensori particolarmente robusti, sterilizzabili con il calore, e in grado di funzionare a lungo senza calibrazione. Altri parametri vengono misurati in continuo ma su correnti di fluidi (liquidi o gassosi) in entrata o in uscita dal fermentatore (a monte o a valle delle zone che devono essere mantenute sterili): questa modalità di misura, detta **on-line**, non richiede sensori sterilizzabili. Infine, per alcuni parametri non sono disponibili sistemi di misura che consentano risposte immediate: per la misurazione, che avviene **off-line**, in maniera discontinua, è necessario prelevare campioni che vengono poi analizzati all'esterno del fermentatore con una varietà di metodi chimici o enzimatici. La necessità di archiviare, rappresentare graficamente, stampare, integrare o controllare con algoritmi complessi (basati su modelli matematici) una grande varietà di parametri di processo, ha portato allo sviluppo di software specializzati. Questi possono essere utilizzati su semplici computer o *workstation* che permettono il monitoraggio e il controllo contemporaneo di numerosi fermentatori.

17.8 Lo sviluppo dei processi fermentativi

Le condizioni per la produzione industriale di metaboliti tramite processi di fermentazione vengono ottimizzate attraverso una serie di passaggi successivi, che si svolgono in scale progressivamente crescenti. Ad esempio, le procedure di scree-

ning conducono alla selezione di idonei ceppi microbici, all'ottimizzazione della composizione del substrato, alla scelta della temperatura di fermentazione ecc. Queste procedure vengono spesso condotte su piccola o piccolissima scala (da 10 a 500 mL) in beute agitate. Benché in queste condizioni non sia possibile il controllo di alcuni parametri, è possibile eseguire molte prove con costi ridotti (*vedi* anche parr. 17.6 e 17.7). La fase successiva viene condotta in genere in fermentatori da laboratorio (2-40 L). In questa fase è possibile:

- controllare tutti i parametri fondamentali;
- scegliere la tipologia di fermentatore (ad agitazione meccanica, pneumatica o idraulica ecc.);
- ottimizzare agitazione e trasferimento di ossigeno;
- scegliere modalità di fermentazione (batch, fed-batch, continuo);
- studiare la macrocinetica del processo.

I passaggi successivi avvengono nella scala del fermentatore pilota (50 L-1 m³) e nella scala dei fermentatori industriali (1-200 m³ e oltre) e permettono di confermare le condizioni sviluppate nella scala di laboratorio. Poiché si passa attraverso scale crescenti, l'intero processo di messa a punto prende il nome di **processo di scale-up**. Il passaggio da una scala all'altra non è tuttavia un processo di semplice esecuzione. Tra i **problemi** che si presentano è possibile citare i seguenti:

- nei grandi fermentatori le condizioni di trasferimento di massa e di energia possono essere anche molto diverse da quelle che si riscontrano nei piccoli fermentatori da laboratorio, con creazione di gradienti e zone morte;
- nelle scale pilota e industriale vengono generalmente usati per la formulazione dei terreni di coltura ingredienti grezzi, diversi da quelli usati nella fase di laboratorio;
- le stesse condizioni di preparazione dell'inoculo e di sterilizzazione del substrato possono essere sostanzialmente differenti nelle diverse fasi.

Come guida al trasferimento delle condizioni operative, nel corso del processo di scale-up vengono usati alcuni parametri adimensionali, relativamente insensibili alla scala utilizzata. Passando da una scala all'altra è opportuno mantenere costanti il k_LA (coefficiente di trasferimento di massa dell'ossigeno), la velocità di trasferimento dell'ossigeno, la potenza di agitazione per unità di volume, la velocità periferica delle giranti. In scale diverse uno stesso k_LA corrisponde a un insieme di condizioni per il trasferimento dell'ossigeno anche molto diverse (velocità di agitazione, dimensione e geometria delle giranti, portate di areazione).

17.9 Il downstream processing

Con il termine "downstream processing" si intendono tutte le procedure utilizzate per il **recupero dei prodotti metabolici** ottenuti da un processo "fermentativo". Questi possono essere suddivisi in due classi principali che determinano il tipo di tecnica di recupero utilizzata:

- biomasse microbiche;
- metaboliti.

Per recuperare la biomassa è necessario separare le cellule dalla fase liquida (**filtrato o surnatante colturale**), mentre il recupero di un metabolita dipenderà, oltre che dalle sue caratteristiche chimico-fisiche, anche dalla sua localizzazione (**extracellulare o intracellulare**). La procedura di recupero più idonea dipende dai seguenti fattori:

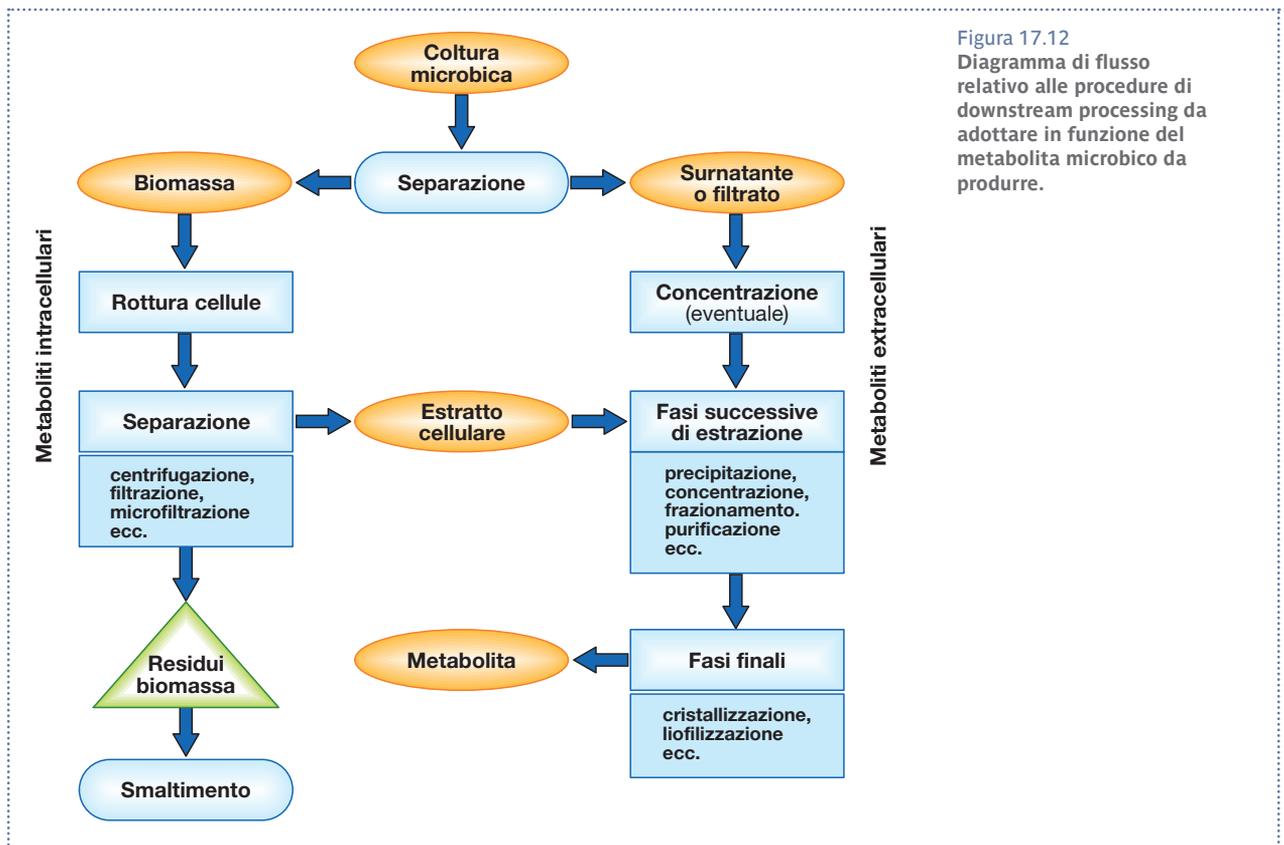


Figura 17.12
Diagramma di flusso relativo alle procedure di downstream processing da adottare in funzione del metabolita microbico da produrre.

- concentrazione del metabolita, degli eventuali sottoprodotti e dei nutrienti residui non utilizzati dal metabolismo microbico;
- stabilità delle molecole prodotte ai diversi parametri utilizzati (ad esempio pH, temperatura, presenza di solventi e/o di sali ecc.);
- costi dell'intera procedura, che talvolta condizionano lo sviluppo di un processo dalla scala di laboratorio a quella industriale.

In figura 17.12 è riportato un diagramma di flusso relativo alle procedure di downstream processing da adottare in funzione dei differenti metaboliti ottenuti.

17.9.1 Tecniche per la separazione della biomassa

La tecnologia di separazione più idonea dipende dal tipo di microrganismo impiegato (batteri, lieviti, funghi filamentosi), nonché dal grado di viscosità della coltura microbica. Poiché le cellule con dimensioni inferiori a 10 μm si depositano con estrema lentezza, la **sedimentazione spontanea** è una procedura utilizzata solo nei processi tradizionali di produzione delle bevande alcoliche (ad esempio vino, birra ottenuta con fermentazione bassa).

La **flocculazione** è una procedura che si basa sulla formazione di aggregati cellulari che, in virtù delle aumentate dimensioni, sedimentano con maggiore facilità. In genere tale condizione si raggiunge sia alterando le condizioni di repulsione elettrostatica tra cellule (ad esempio per modifica del pH o per aggiunta di elettroliti) sia sfruttando fenomeni di adsorbimento (ad esempio tramite aggiunta di polimeri adsorbenti).

La **flocculazione** (favorita dall'aggiunta di amine o di acidi grassi a lunga catena e utilizzata prevalentemente per i batteri) si basa sull'adsorbimento delle cellule microbiche sulla superficie di bolle di gas immesso all'interno della coltura. La

risalita della schiuma sulla parte alta del fermentatore trasporta con sé la biomassa microbica adsorbita.

La **filtrazione** è una procedura impiegata soprattutto per microrganismi con sviluppo di tipo miceliare (ad esempio attinomiceti e funghi filamentosi) ed è ottenuta soprattutto tramite filtri (filtri di carta, tessuto, cellulosa o lana di vetro). Gli altri tipi di microrganismi possono essere separati, invece, con processi di **microfiltrazione tangenziale** (a membrana). In questi processi, il fluido da filtrare viene separato, attraverso una membrana semipermeabile, in due flussi, il permeato (la frazione che passa attraverso la membrana) e il concentrato (la frazione che non passa attraverso la membrana e si arricchisce in soluti o solidi sospesi). Il flusso tangenziale, anziché perpendicolare come nella filtrazione tradizionale, riduce l'effetto di colmatazione delle membrane. Queste possono essere costituite da materiali di diverso tipo, con porosità variabile, generalmente < 0,2 mm. Tuttavia, la riduzione della permeabilità dei filtri, osservata nel corso del processo, che può condizionarne in misura rilevante la resa.

La **centrifugazione** si basa sul principio di separazione di componenti a diverso peso specifico tramite applicazione di forze di tipo centrifugo e presenta di norma rese (ma anche costi) più elevate rispetto alla filtrazione. Esistono attualmente differenti tipologie di centrifughe: decanter, centrifughe a piatti e centrifughe tubolari che, in funzione delle caratteristiche delle cellule microbiche da separare, garantiscono prestazioni e applicazioni diversificate.

In tutti i casi sopra citati, dopo separazione e lavaggio delle cellule, il filtrato colturale costituisce un sottoprodotto che, se riutilizzabile, viene sterilizzato, concentrato ed essiccato, altrimenti deve essere sottoposto a smaltimento.

17.9.2 Tecniche per il recupero dei metaboliti

Come sopra ricordato, la **differente localizzazione** dei metaboliti microbici (**intracellulare o extracellulare**) ne influenza in maniera notevole le tecniche di recupero. Nel primo caso una fase preliminare consiste nel **recupero** della biomassa e nella successiva **rottura delle cellule** (tramite metodi fisici, chimici o biologici), mentre nel secondo caso la **separazione** della biomassa rappresenterà la fase preliminare per le successive operazioni condotte direttamente sul **filtrato colturale** (ad esempio processi di estrazione, precipitazione, concentrazione, frazionamento e purificazione). In questo caso, la biomassa costituisce un residuo che, se riutilizzabile, viene sterilizzato ed essiccato e può essere utilizzato, sotto forma di biomassa non vitale, come alimento zootecnico (se la specie è consentita per legge), o nella produzione di idrolizzati cellulari (es.: estratto di lievito); altrimenti deve essere sottoposto a smaltimento. Tra i principali metaboliti intracellulari possiamo citare gli acidi nucleici e alcuni enzimi. Tra quelli extracellulari citiamo gli acidi organici, gli antibiotici, alcuni enzimi e i polisaccaridi.

L'**estrazione** prevede il trasferimento del metabolita da una fase acquosa (filtrato colturale o estratto cellulare) a una fase organica (ad esempio solvente), in funzione delle sue caratteristiche di polarità. La **precipitazione** di un metabolita consiste invece nella riduzione della sua solubilità tramite impiego di sali (ad esempio solfato ammonico, cloruro di sodio) o di solventi (ad esempio etanolo, acetone), oppure tramite la formazione di complessi insolubili, ottenibili tramite agenti complessanti (ad esempio acido tannico per le proteine, sali di calcio per gli acidi organici).

La **concentrazione** permette di ottenere una riduzione di volume (tramite evaporazione o ultrafiltrazione), mentre il **frazionamento** permette di separare la frazione contenente il metabolita prodotto e di eliminare una parte di altri metaboliti (sottoprodotti del processo).

La **purificazione**, infine, consente la rimozione di ulteriori composti presenti fino al grado di purezza desiderato. Questa può essere ottenuta tramite tecniche cromatografiche (a fase inversa, a scambio ionico, di adsorbimento, di affinità,

gel filtrazione), distillazione (metaboliti a basso punto di ebollizione, ad esempio etanolo), processi di estrazione a membrana (differenziabili in funzione del *cut-off*: osmosi inversa da 0,0001 a 0,001 μm , ultrafiltrazione da 0,001 a 0,1 μm , microfiltrazione da 0,1 a 10 μm).

17.10 I principali prodotti della microbiologia industriale

17.10.1 Biomasse microbiche

La produzione di biomasse microbiche presenta differenti finalità. Le biomasse microbiche destinate a essere utilizzate integralmente (in alimentazione umana o animale) sono state definite **Single Cell Protein (SCP)** o, talvolta, **Pluricellular Organism Protein (POP)**, nel caso di impiego di funghi filamentosi). La loro produzione ha avuto alterne vicende, in ragione di considerazioni di ordine prevalentemente economico. In particolare, per questo tipo di produzione risulta fondamentale l'impiego di substrati a basso costo e rinnovabili. Al contrario, i processi basati su fonti di C di origine fossile (ad esempio *n*-alcani) hanno perso di interesse in considerazione dell'aumento dei prezzi del petrolio, che ha reso le SCP non competitive nei confronti della fonte proteica di riferimento (soia). Inoltre, il sospetto di cancerogenicità da parte degli *n*-alcani adsorbiti sulla parete delle cellule microbiche ha determinato l'abbandono di questa produzione ai fini mangimistici. Infatti, solo un numero molto limitato dei numerosi processi sviluppati a partire dagli anni sessanta del secolo scorso è stato trasferito su larga scala per la produzione di biomasse non vitali da destinare, potenzialmente, all'alimentazione animale e/o umana (tab. 17.11).

Tabella 17.11 Alcuni processi per la produzione di biomasse.

Processo	Substrato	Microrganismo	Condizioni operative	Y	Resa di fermentazione
Pruteen	Metanolo	<i>Methylophilus methylotrophus</i>	35-37 °C, pH 6,5-6,9	0,5	25-30 g/L
Bioprotein Pronin	Metano (gas naturale, dal Mare del Nord)	<i>Methylococcus capsulatus</i>	45 °C, 24 h		20 g/L
BEL Protibel	Siero di latte	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> (ex <i>Kluyveromyces fragilis</i>)	Processo continuo, 38 °C, pH 3,5	0,45-0,55	circa 25 g/L
SYMBA	Residui di lavorazione delle patate	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> e <i>Candida utilis</i> in associazione	A due stadi in continuo: I stadio: sviluppo di <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> , che idrolizza l'amido, in reattore di piccole dimensioni II stadio (300 m ³): inoculo contemporaneo con <i>Candida utilis</i> e con la coltura di <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> dal I stadio	–	–
PEKYLO	Liscivio solfitico eventualmente integrato con melasso o siero di latte	<i>Paecilomyces variotii</i>	38 °C, pH 4,5	–	13-15 g/L Contenuto proteico circa 60%
QUORN	Sciroppo di glucosio (da amido di mais/patata/frumento); biotina e sali minerali	<i>Fusarium venetum graminearum</i> (<i>Fusarium graminearum</i> ATCC)	30 °C, pH 6	–	15-20 g/L, 300-350 kg di biomassa/h

Fra le biomasse attive (destinate a essere impiegate in funzione della loro attività in substrati/ambienti complessi) le **colture starter** per la produzione di diversi alimenti e bevande fermentate rappresentano l'impiego più affermato e diffuso. In particolare, la più antica è senza dubbio la **produzione di lievito per panificazione**, nota in Olanda già nel 1781 (**Dutch process**) e messa a punto come processo industriale in Austria nel 1846. Tale processo, che utilizzava inizialmente il lievito residuo dalla produzione di birra (*Saccharomyces carlsbergensis*, successivamente classificato come *Saccharomyces pastorianus*), impiega oggi ceppi selezionati di *Saccharomyces cerevisiae*. Il substrato è costituito da melasso (di barbabietola o di canna), pre-trattato e integrato con una fonte di N inorganico (sali di ammonio). Condizioni operative: 28-32 °C; pH 4,0-4,5; aerazione = 1 vvm. Il processo, che ha una durata totale di 12-16 ore, presenta la particolarità di prevedere una graduale aggiunta della fonte di C (coltura fed-batch), per mantenere la concentrazione zuccherina a livelli < 50 g/L, al fine di evitare l'effetto Crabtree (passaggio del metabolismo del lievito da ossidativo a fermentativo: vedi anche par. 17.4). Anche l'aerazione viene aumentata gradualmente fino a uno stadio finale, successivo al consumo delle sostanze nutritive. Dopo questo stadio finale l'aerazione procede (anche se diminuita) per qualche ora, per permettere la "maturazione" del lievito (determinata dall'aumento del contenuto intracellulare di trealosio che incrementa la stabilità delle cellule).

Più recentemente, la produzione di biomasse microbiche attive si è orientata anche all'ottenimento di colture destinate all'agricoltura:

- **colture di batteri insetticidi (biopesticidi)**, per lo più costituite da ceppi di *Bacillus thuringiensis* (produttori di endotossine attive su diversi tipi di insetti parassiti di piante);
- **colture di batteri azotofissatori**, costituite da biomasse attive di microrganismi appartenenti al genere *Rhizobium* (azotofissatori simbiotici di piante leguminose). In quest'ultimo caso il prodotto commerciale è costituito dalla biomassa microbica miscelata a un supporto inerte (generalmente torba sterile), da applicare ai semi delle leguminose.

17.10.2 Etanolo

Nonostante l'abilità di produrre bevande alcoliche da parte di lieviti della specie *Saccharomyces cerevisiae* sia un evento documentato da secoli, l'utilizzazione di etanolo prodotto tramite processi fermentativi come solvente o per uso energetico (ad esempio **biocarburante**) è un'acquisizione relativamente recente. Attualmente, la produzione di etanolo ammonta a circa 30 milioni di tonnellate/anno, di cui circa il 70% è ottenuto tramite processi fermentativi batch o in continuo, il restante per via chimica (ossidazione dell'etilene).

L'interesse per l'utilizzazione di etanolo come biocarburante ha avuto nel corso dei decenni un andamento altalenante, principalmente in risposta alle fluttuazioni del prezzo del petrolio. Poiché in questo tipo di produzioni il costo del substrato incide per il 55-75% sul costo complessivo dell'unità di prodotto, l'utilizzazione di etanolo come biocarburante appare economicamente conveniente solo nel caso in cui vengano utilizzate fonti di carbonio a basso costo. A partire dagli anni ottanta del secolo scorso, alcune nazioni (in particolare Brasile e Cuba) hanno pertanto avviato processi di produzione su scala industriale in virtù della possibilità di disporre di grandi quantità di **biomasse di scarto di origine agro-industriale** (ad esempio melassi di canna e di barbabietola, amido da cereali o da patate).

Altre interessanti possibilità possono essere rappresentate dalla fermentazione di residui lignocellulosici idrolizzati operata da lieviti delle specie *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus*. Approcci innovativi consistenti

Tabella 17.12 Caratteristiche dei principali processi per la produzione di etanolo.

Processo	Volumi	Substrati	Rese di fermentazione
Batch convenzionale	600-100 m ³	Melassi amidi pre-idrolizzati	70 g/L
Continuo con riciclo cellulare (Biostil)	600-100 m ³	Melassi	86 g/L

nella simultanea isomerizzazione e fermentazione (**SIF**) di xilosio o nella simultanea isomerizzazione e co-fermentazione di miscele glucosio/fruttosio in presenza dell'enzima xilosio isomerasi (**SICF**) sono stati recentemente proposti. Tuttavia, nonostante le numerose ricerche, a causa degli elevati costi, questo tipo di produzione non ha finora superato lo stadio di impianto di fermentazione da laboratorio.

In tabella 17.12 sono riassunte le caratteristiche dei principali processi per la produzione di etanolo.

17.10.3 Acidi organici

Gli acidi organici ottenibili da microrganismi possono essere classificati sulla base della loro posizione nel metabolismo microbico in:

- acidi organici intermedi del ciclo di Krebs (ad esempio **acido citrico**);
- acidi organici prodotti per ossidazione diretta (ad esempio **acido gluconico**);
- acidi organici ottenibili da metabolismo anaerobio (ad esempio **acido lattico, acido propionico, acido butirrico**).

A differenza di molti altri processi, la produzione di acidi organici per via microbica risulta in genere competitiva rispetto ad analoghi processi sviluppati per via chimica. A determinare questo vantaggio concorrono una serie di condizioni:

- impiego di ceppi con caratteristiche particolari (ad esempio mutanti iperproduttori);
- uso di fonti di carbonio a basso costo;
- costi di downstream processing in genere contenuti.

In tabella 17.13 sono riassunte le caratteristiche dei principali processi per la produzione di alcuni acidi organici.

17.10.4 Vitamine

Sebbene nella maggior parte dei microrganismi siano attive tutte le vie biosintetiche per la loro sintesi, le vitamine sono state per lungo tempo ottenute per estrazione da tessuti animali o vegetali. Nonostante le numerose ricerche rivolte alla produzione di vitamine per via microbica, problemi di tipo economico (rese di fermentazione troppo basse ed elevati costi di downstream processing) hanno tuttavia fortemente limitato lo sviluppo della maggior parte dei processi studiati.

Tabella 17.13 Caratteristiche dei principali processi per la produzione di alcuni acidi organici.

Microrganismi	Acido organico	Substrati	Y	Rese di fermentazione
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Acido lattico	Glucosio	0,95	135 g/L
<i>Aspergillus niger</i>	Acido citrico	Melassi amidi idrolizzati	0,7-0,8	110-125 g/L
<i>Aspergillus niger</i>	Acido gluconico	Glucosio	0,95	170-200 g/L

Tabella 17.14 Caratteristiche dei processi di produzione microbiologici o microbiologici/sintetici di alcune vitamine.

Processo	Microrganismi	Vitamina	Substrati	Rese di fermentazione	Fasi successive
Bi-stadio Reichstein (M-C)	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Acido ascorbico (vit. C)	Sorbosio	180 g/L di sorbitolo	Trasformazione del sorbitolo in acido ascorbico
Tri-stadio (M-M-C)	<i>Erwinia punctata</i> (stadio 1)	Acido ascorbico (vit. C)	Glucosio	300 g/L di acido 2,5-dicheto-D-gluconico	Trasformazione dell'acido 2-cheto-L-gluconico in acido ascorbico
	<i>Corynebacterium</i> sp. (stadio 2)		Acido 2,5-dicheto D-gluconico	100 g/L di acido 2-cheto-L-gluconico	
Bi-stadio (M-M)	<i>Propionibacterium shermanii</i>	Cianocobalamina (vit. B ₁₂)	Glucosio + 2,5-dimetil benzimidazolo	150 g/L	–
Bi-stadio (M-M)	<i>Ashbya gossypii</i>	Riboflavina (vit. B ₂)	Glucosio	> 10 g/L	–
Batch	<i>Candida famata</i>	Riboflavina (vit. B ₂)	Glucosio	> 20 g/L	–

Legenda: M = microbiologico; C = chimico

L'impiego di microrganismi su scala industriale è oggi ristretto a quei casi (ad esempio produzione di **cianocobalamina**, **vitamina B₁₂**) nei quali la sintesi chimica risulta troppo complessa oppure l'estrazione da altre matrici biologiche troppo costosa. Altri esempi di produzione di vitamine tramite biotecnologie microbiche sono quelli relativi alla **riboflavina** (**vitamina B₂**) e all'**acido ascorbico** (**vitamina C**, ottenuta per combinazione di tecnologie microbiologiche e chimiche).

In tabella 17.14 sono riassunte le caratteristiche principali relative ai processi di produzione microbiologici o microbiologici/sintetici di alcune vitamine.

17.10.5 Aminoacidi

Gli aminoacidi trovano numerosi usi nell'industria alimentare, mangimistica, farmaceutica. Fino alla prima metà del Novecento venivano ottenuti prevalentemente per estrazione e purificazione da fonti proteiche di scarto, mentre a partire dal 1960 sono stati sviluppati numerosi processi fermentativi per la produzione di aminoacidi come acido glutamico, lisina, treonina, triptofano, valina ecc.

Dal momento che la produzione di aminoacidi nelle cellule è strettamente controllata sia mediante la repressione dei geni per la sintesi sia tramite un meccanismo di retroinibizione, per realizzare un accumulo di aminoacidi nel substrato è necessario usare mutanti deregolati e/o opportune condizioni di fermentazione (vedi par. 17.5).

Molte delle specie utilizzate per la produzione di aminoacidi appartengono al gruppo dei corinebatteri (*Corynebacterium glutamicum*, *Microbacterium ammoniaphilum*, *Brevibacterium flavum* ecc.). In questo gruppo, infatti, la regolazione delle vie metaboliche per la produzione di molti aminoacidi importanti (ad esempio **acido aspartico** e **acido glutamico**) è molto semplice ed è relativamente facile ottenere mutanti iperproduttori. In particolare, ceppi di *Corynebacterium glutamicum*, ottenuti senza impiego di tecniche di mutazione (**ceppi selvaggi**), sono in grado di produrre quantità significative di acido glutamico utilizzando condizioni che favoriscono la produzione di pareti e membrane difettose, come la carenza di biotina, o la presenza di piccole quantità di penicillina, o di Tween 80 (un agente tensioattivo che aumenta la permeabilità degli involucri cellulari): queste determinano la fuoriuscita dell'acido glutamico riducendo la retroinibizione della glutamato deidrogenasi. Tuttavia, per raggiungere livelli di produzione più elevati (80-150 g/L) è necessario utilizzare mutanti con sensibilità ridotta alla retroinibizione oppure privi degli enzimi (ad esempio a-chetoglutarato deidrogenasi) che sottraggono i precursori della sintesi. Per la produzione di amino-

cidi della famiglia dell'acido aspartico sono necessari processi di miglioramento genetico più complesso che prevedono l'ottenimento di mutanti auxotrofi o di mutanti regolatori (*vedi par. 17.5*).

Più recentemente, alla selezione di mutanti di vario tipo si preferisce l'intervento mediante ingegneria genetica, con inserimento di plasmidi che contengono operoni per la produzione di aminoacidi modificati nelle funzioni di regolazione o contenenti copie multiple dei geni biosintetici.

17.10.6 Enzimi

Un gran numero di enzimi, prodotti tramite processi fermentativi, sono entrati nell'uso quotidiano. **Lipasi** e **proteasi alcaline**, prodotte da ceppi di *Bacillus amyloliquefaciens*, sono frequentemente usate nei detersivi per facilitare la rimozione di grassi e proteine dai tessuti. **Proteasi acide** prodotte da funghi filamentosi (come *Endothia parasitica*, *Rhizomucor miehei*) sono utilizzati come sostituti del caglio. Più recentemente, si sono diffuse preparazioni a base di **chimosina** (l'enzima responsabile della coagulazione del latte, contenuto nel caglio) prodotta con ceppi ricombinanti di *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* o *Kluyveromyces marxianus* (precedentemente classificato come *Kluyveromyces fragilis*).

Diversi tipi di enzimi amilolitici (**amilasi**, **glucoamilasi**) e **isomerasi** vengono utilizzati nella produzione di sciroppi di glucosio o di fruttosio a partire da materiali amilacei, che vengono utilizzati direttamente nell'industria alimentare o come substrato per ulteriori fermentazioni. Enzimi pectinolitici (**poligalatturonasi**, **pectina-metil-esterasi**, **pectina liasi**) sono utilizzati per facilitare l'estrazione di succhi vegetali o per migliorare la chiarificazione di alcune bevande. Altri enzimi sono invece utilizzati per applicazioni in campo farmaceutico, come la **penicillina amilasi**, prodotta da mutanti di *Escherichia coli* e utilizzata per ottenere acido penicillanico, un precursore delle penicilline semisintetiche. Infine, altri enzimi prodotti tramite processi "fermentativi" vengono correntemente utilizzati per preparazioni analitiche, come la **Taq-polimerasi** o la **Pfu-polimerasi**, utilizzate nella reazione a catena della polimerasi.

17.10.7 Antibiotici

Dalla scoperta della penicillina (il primo antibiotico caratterizzato dall'uomo) a oggi sono stati scoperti, purificati e caratterizzati oltre 4000 antibiotici, almeno 50 dei quali sono utilizzati per il trattamento di malattie di uomo e animali (spesso sono di natura semisintetica, per aumentarne lo spettro di inibizione o migliorarne alcune proprietà). Gli antibiotici sono metaboliti secondari, caratterizzati da strutture chimiche estremamente variabili (fig. 17.13). La maggior parte dei ceppi produttori possono essere isolati fra i microrganismi del suolo, come funghi filamentosi, attinomiceti, batteri del genere *Bacillus*, per i quali la produzione di inibitori costituisce un importante vantaggio competitivo in un habitat estremamente selettivo, come il suolo. A causa dello sviluppo e della diffusione di microrganismi antibiotico-resistenti, soprattutto in ambito nosocomiale, la ricerca di nuovi composti ad azione antibiotica prosegue e molecole sempre più potenti e specifiche vengono continuamente sviluppate.

Le **penicilline** sono probabilmente gli antibiotici più noti. Le penicilline naturali (G e V) sono prodotte da mutanti selezionati di *Penicillium chrysogenum*, che permettono di ottenere in una fermentazione fed-batch più di 50 g/L di penicillina, contro gli 0,1 mg/L prodotti dal ceppo di *Penicillium notatum* originariamente isolato da Alexander Fleming nel 1928. Le penicilline naturali sono oggi estensivamente trasformate per mezzo di modificazioni enzimatiche e chimiche in modo da ottenere prodotti con spettro di inibizione più ampio, come le aminopenicilline **ampicillina** e **amoxicillina**, o le carbossipenicilline (**carbencillina**), o le penicilline resistenti alle penicillasi (**meticillina**, **cloxacillina**).

Un gran numero di altri antibiotici sono prodotti da batteri, come gli antibiotici polipeptidici **bacitracina** (*Bacillus subtilis*) e **polimixina B** (*Paenibacillus polymyxa*), da attinomiceti, come gli aminoglicosidi **streptomina** (*Streptomyces griseus*) e la **neomicina** (*Streptomyces fradiae*), le **tetracicline** (prodotte da vari membri del genere *Streptomyces*), gli antibiotici antifungini **amfotericina B** (*Streptomyces nodosus*) e **nistatina** (*Streptomyces noursei*) e la **vancomicina** (*Streptomyces orientalis*). La produzione commerciale avviene in fermentatori generalmente ad agitazione meccanica, utilizzando sia mutanti selezionati sia substrati complessi, spesso con modalità fed-batch allo scopo di estendere la fase produttiva che inizia solo al termine della crescita.

17.10.8 Esopolisaccaridi

Molti microrganismi (procarioti ed eucarioti) sintetizzano **polisaccaridi extracellulari (EPS)**, per lo più idrosolubili, che possono essere facilmente recuperati dal filtrato colturale tramite precipitazione con solventi organici, sali o acidi. Queste molecole possono essere così classificate:

- in base alla loro composizione chimica (EPS omo- o eteropolisaccaridi);
- in base alla loro struttura (EPS lineari o ramificati);
- in base alla carica (EPS neutri, anionici o cationici).

In funzione di queste caratteristiche presentano una grande varietà di impieghi, soprattutto in campo alimentare (emulsionanti, stabilizzanti, gelificanti) e farmaceutico.

La produzione maggiormente affermata è quella dello **xantano**, eteropolisaccaride anionico ramificato, prodotto utilizzando la specie *Xanthomonas campestris*. È costituito da una catena principale di unità di glucosio (con legami β-1,4): a ogni due unità glucidiche sono legate catene laterali di unità trisaccaridiche di mannosio-acido glucuronico-mannosio (in cui gruppi acetato e piruvato possono legarsi, rispettivamente, a unità di mannosio prossimali e distali). Lo xantano presenta numerosi e differenti impieghi: in campo alimentare (dove è autorizzato come additivo con funzione stabilizzante e addensante: Gomma di xanthan - E415) e in settori non alimentari (tessile, petrolchimico ecc.).

Altri EPS prodotti tramite fermentazioni su scala industriale sono:

- **destrano**, omopolisaccaride neutro lineare prodotto utilizzando *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *destranicum* e costituito da unità monometriche di glucosio. È prevalentemente destinato alla produzione di resine per uso analitico (*Sephadex*) e al settore farmaceutico;
- **gellano**, eteropolisaccaride acido lineare costituito da unità ripetute composte di: glucosio, acido glucuronico, glucosio e ramnosio. È parzialmente acetilato (sulle unità di glucosio) ed è prodotto utilizzando la specie *Sphingomonas paucimobilis* (*Pseudomonas elodea*). È utilizzato per il settore alimentare (addensante) dove è autorizzato come additivo (Gomma di gellano - E418);
- **curdlano**, omopolisaccaride neutro lineare, insolubile, prodotto utilizzando *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*. Questo polisaccaride viene prodotto prevalentemente in Giappone, dove è utilizzato nel settore alimentare (al momento non è autorizzato in Europa);
- **pullulano**, omopolisaccaride neutro lineare del glucosio, costituito da unità ripetute di tre residui (legame α-1-4), legate fra loro tramite legami α-1-6. È prodotto da *Aurobasidium pullulans* ed è impiegato prevalentemente in Giappone per la realizzazione di film biodegradabili.
- **alginato**, esopolisaccaride microbico con interessanti potenzialità (in cam-

po alimentare e farmaceutico). Si tratta di un eteropolisaccaride anionico lineare, prodotto da *Azotobacter vinelandii* e da alcune specie di *Pseudomonas*, costituito da molecole, variamente arrangiate, di acido L-guluronico e D-mannuronico (queste ultime eventualmente acetilate). L'alginato è attualmente prodotto per estrazione da alghe brune e autorizzato per l'uso come additivo alimentare con proprietà addensanti e gelificanti.

