



**Prodotti  
da processi  
biotecnologici**

**Metaboliti primari**

# Indice

In copertina

**Bioethanol burner**

CCO license

By pexels.com

Introduzione

Acidi organici: acido lattico, acido citrico, acido gluconico  
Approfondimento: carboni attivi

Bioetanolo

Enzimi

Amminoacidi: L-lisina, acido glutammico

Approfondimento: resina a scambio ionico

Approfondimento: cofattori e coenzimi

Vitamine: vitamina B<sub>12</sub>

Photo credits

# Introduzione



BioTechnologySanitarie.it

# Introduzione: metaboliti primari

Tutte le scoperte scientifiche degli ultimi cinquant'anni hanno trovato nella microbiologia industriale un campo applicativo di notevole importanza.

I microbi sono degli ottimi laboratori di produzione se si conoscono bene le loro caratteristiche strutturali e il loro metabolismo e se si riesce a farli moltiplicare su larga scala. Soddisfano pienamente l'esigenza industriale di **contenere i costi** sia dal punto di vista dei materiali necessari che dell'energia da utilizzare.

# Introduzione: metaboliti primari

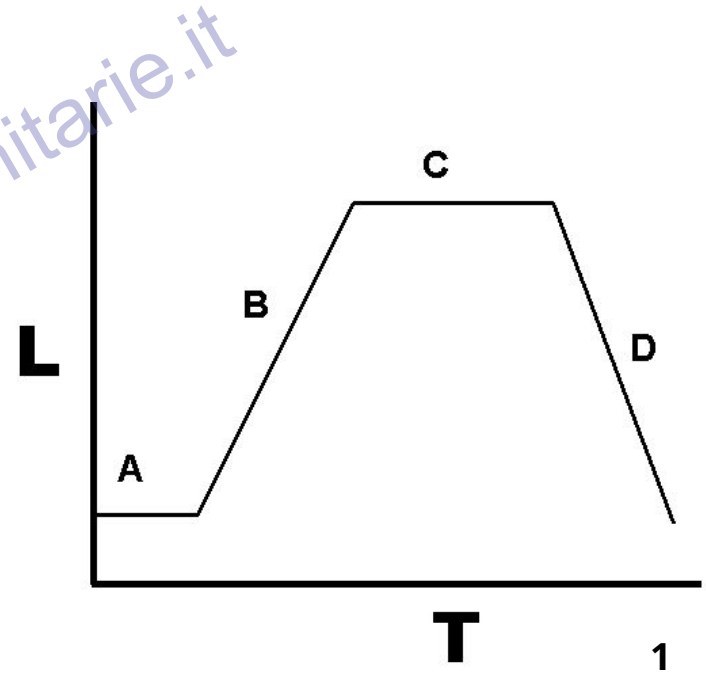
In molti casi possono essere **standardizzate le procedure**, altra esigenza fondamentale nell'industria. Anche se il processo deve essere continuamente monitorato perché l'imprevisto può essere dietro l'angolo visto che si opera con organismi viventi.

Inoltre i microrganismi e i loro enzimi attraverso la tecnologia del DNA ricombinante possono essere **trasformati in strutture altamente specifiche** per la produzione di alcune sostanze e questo li rende ulteriormente preziosi per l'industria.

# Introduzione: metaboliti primari

Questa presentazione è dedicata ai derivati del metabolismo primario di batteri e funghi, prodotti quindi durante la fase di crescita esponenziale o trofofase (**B** nel grafico).

È il momento in cui consumo dei nutrienti e di energia sono strettamente associati alla crescita.



# Introduzione: metaboliti primari

Ovviamente si tratta di **sostanze essenziali** per il microrganismo coinvolto. Sia dal punto di vista strutturale (aminoacidi, proteine, lipidi, acidi nucleici ...) che del metabolismo energetico (etanolo, butanolo, acetone ...)

Come al solito per tutte le regole va sottolineata anche l'eccezione.

Quindi nelle prossime diapositive scoprirete che l'acido citrico viene prodotto nella fase C, detta anche idiofase o fase stazionaria, tipica dei metaboliti secondari.

# ACIDI ORGANICI

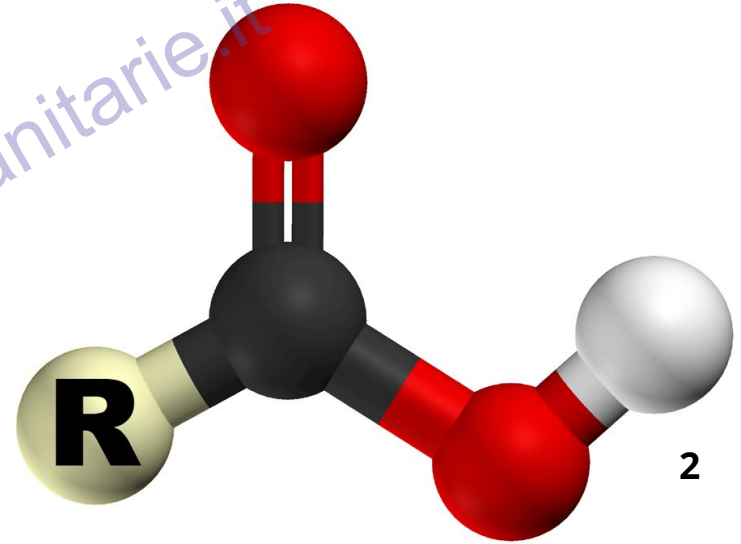


BioTechnologySanitarie.it



# Acidi organici

Gli **acidi organici o carbossilici** sono molecole organiche che contengono il gruppo carbossilico o carbossile (-COOH). Sono acidi deboli, molto diffusi. Noi ci occuperemo della produzione di acido lattico, citrico e gluconico.



Modello molecolare di un acido carbossilico  
R=gruppo alchilico  
Nero=carbonio Rosso=ossigeno Bianco=idrogeno



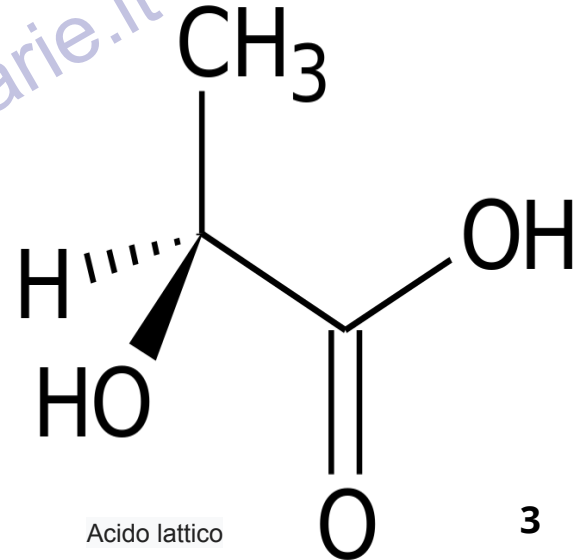
# Acido lattico

# Introduzione: acido lattico

Acido lattico  $[\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}]$

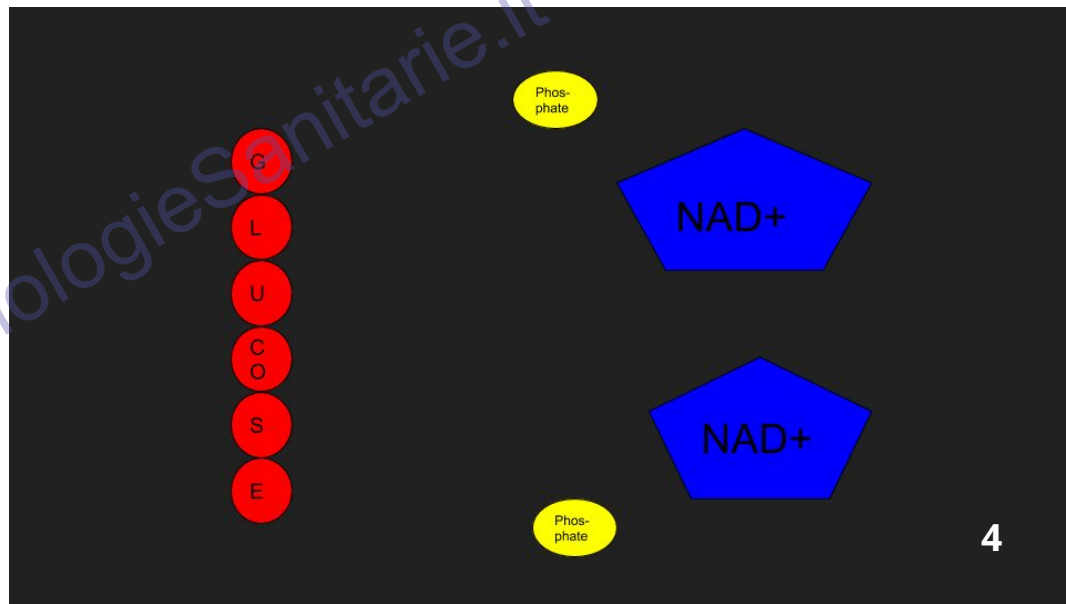
È un idrossiacido che svolge un ruolo fondamentale in molti processi biochimici.

Viene prodotto in modo specifico durante la fermentazione omolattica che viene descritta nella prossima slide.



# Acido lattico

Questa animazione si concentra su una molecola di glucosio che si trasforma in piruvato e poi in acido lattico. Nel processo c'è una molecola di glucosio a 6 atomi di carbonio e 2 molecole di NAD<sup>+</sup>. 2 fosfati si attaccano alle estremità della molecola di glucosio, dividendo la molecola di glucosio in 2 molecole di piruvato. Le molecole di NAD<sup>+</sup> aggiungono un altro fosfato sulle estremità aperte delle 2 molecole di piruvato, trasformando i 2 NAD<sup>+</sup> in 2 NADH. Quindi l'ADP arriva e prende i fosfati, creando 2 molecole di ATP. Il piruvato viene trasformato in 2 molecole di lattato. Il processo quindi si ripete, iniziando con un'altra molecola di glucosio.



# Acido lattico

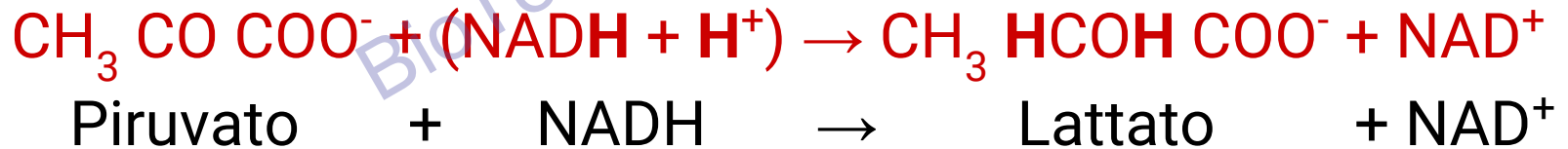
L'animazione precedente riassume molto schematicamente un processo ben più complesso.

Il glucosio, nel processo di glicolisi, viene trasformato in 2 molecole di piruvato (a 3 atomi di carbonio). Nella reazione si formano 4 ATP ma se ne consumano 2 con un bilancio netto di sole 2 molecole di ATP.

Inoltre si formano anche 2 molecole di NADH.

# Acido lattico

In condizioni aerobiche il piruvato entrerebbe nel ciclo di Krebs con demolizione totale in anidride carbonica e acqua. In assenza di ossigeno la reazione non può iniziare; nella cellula rimane un surplus di NADH che, a sua volta, impedisce la reazione stessa. Ed ecco, allora, cosa succede :



La resa energetica è bassa ( i soli 2 ATP) della glicolisi ma l'acido lattico ha ancora un alto contenuto energetico.

# Acido lattico

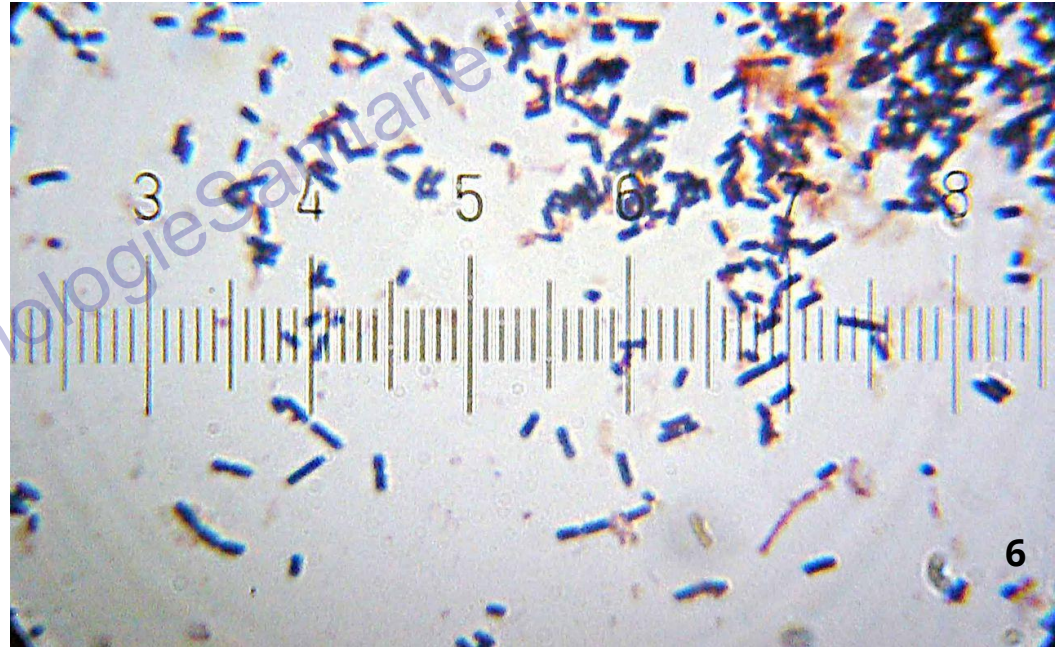
La fermentazione omolattica dovrebbe ricordare, oltre alla situazione tipica del muscolo sotto sforzo nell'organismo umano, una nota produzione alimentare: lo yogurt, che tra l'altro si ottiene anche a casa spesso con metodi artigianali come testimonia la foto accanto.

Lo yogurt, a sua volta, ci ricorda i lattobacilli.



# Acido lattico

I **lattobacilli** vanno ricordati, tra l'altro, anche per il loro ruolo attivo nella protezione da microbi patogeni nella vagina femminile. Si tratta di batteri Gram-positivi anaerobi facoltativi o microaerofili.



Lactobacillus acidophilus



# Acido lattico

A questo punto è ovvio pensare che l'industria ha utilizzato meccanismi naturali per la produzione su larga scala dell'acido lattico. Meccanismi opportunamente studiati e standardizzati. Si è scartata subito l'eterofermentazione perché si sarebbero ottenuti una serie di sottoprodotti con evidenti complicazioni nel recupero (downstream).

È stato scelto il *Lactobacillus delbrueckii* (subsp. *bulgaricus*) che ha un unico difetto, ovvero le sue notevoli esigenze nutritive. E da qui cominciamo per analizzare il processo biotecnologico.

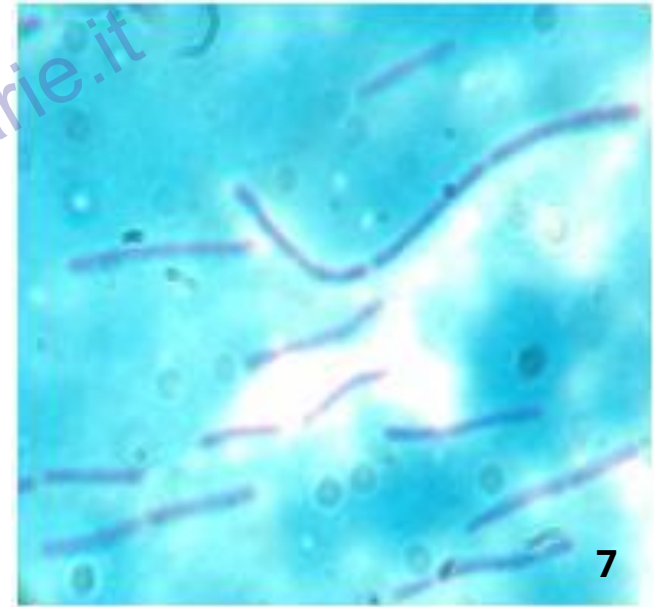
# Acido lattico

Il batterio non produce amilasi e quindi bisogna fare un pretrattamento della materia prima (melassa, siero di latte, prodotti amidacei) per mobilizzare gli zuccheri semplici.

Tecnica: **batch**

Azione tamponante: **CaCO<sub>3</sub>** (per evitare l'eccessiva diminuzione di pH = 6)

Temperatura: **45 - 50°C**



Lactobacillus acidophilus (subsp. bulgaricus)

# Acido lattico

Un altro particolare si ricava dalla conoscenza dei lattobacilli in genere. Per esempio in questo caso non è necessario sterilizzare il terreno perché questo genere di batteri ha un'azione inibente sugli altri microrganismi.

## Downstream:

- trattamento a 80°C per eliminare i batteri fermentanti;
- filtrazione per recuperare la fase liquida;
- chiarificazione su carboni attivi, purificazione e concentrazione;
- precipitazione mediante  $H_2SO_4$  di  $CaSO_4$ ;
- ulteriore purificazione e concentrazione per evaporazione.

# **APPROFONDIMENTO**

## **Carboni attivi**

BioTechnologySanitarie.it

# Carboni attivi

Visto che è stata citata la chiarificazione sui carboni attivi e che è un procedimento molto usato nel downstream è bene fare qualche precisazione.

Il **carbone attivo** è un carbone amorfo che ha una struttura porosa e che offre un'elevata area superficiale per unità di volume. Queste caratteristiche lo rendono particolarmente adsorbente.

**Chiarificazione:** eliminazione della torbidità di una soluzione



Carbone attivo in polvere e in blocco

# Acido lattico

A questo punto, riprendendo l'argomento dell'acido lattico, la domanda da porsi è quale sia il riscontro economico che induce l'industria a produrre in grande quantità l'acido lattico.

Prima di tutto si ricorda la **sintesi di polimeri biodegradabili**. Le **bioplastiche** sono molto richieste al giorno d'oggi e la **PLA** (acido polilattico) viene utilizzata per le bottiglie per l'acqua ma anche per vari tipi di stoviglie (contenitori, piatti, bicchieri e posate in particolare).

La resistenza è analoga alla plastica tradizionale.

# Acido lattico

Altro settore importante è quello alimentare.

L'acido lattico è utilizzato come additivo alimentare e in particolare come **conservante**, vista la sua attività antimicrobica, **acidificante** e **aromatizzante**.

Come acido lattico e lattati (noti con le sigle da E270 a E279) viene addizionato a panna, mozzarella, pasta di pane, pasta fresca, sorbetti, salse, bibite, prodotti di pasticceria, verdure in scatola ...

Non è specificata nessuna DGA (dose giornaliera accettabile).

# Acido lattico

Inoltre l'acido lattico sotto forma di **lattato di ammonio** viene aggiunto ai mangimi per gli animali.

Inoltre viene usato come mordente nella concia delle pelli.

La foto mette in evidenza il procedimento in botti specifiche.







# Acido citrico

# Acido citrico

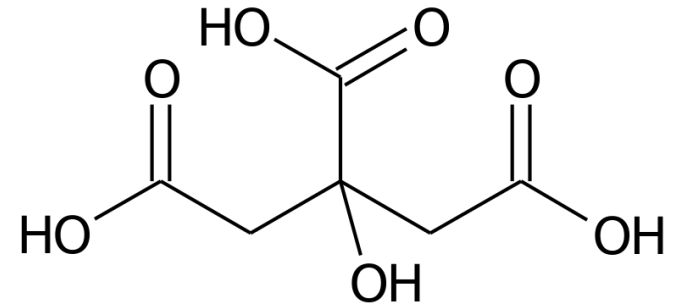
Acido citrico acido tricarbossilico  
con formula bruta  $C_6H_8O_7$

Si trova in natura nella frutta,  
soprattutto gli agrumi.

Limoni: 3 - 4%

Arance: 1%

Presente anche nel legno, nei funghi,  
nel tabacco, nel latte e nel vino.



10

# Acido citrico

Risale alla fine del 1700 la scoperta di come estrarre dal succo di limone l'acido citrico cristallizzato.

Ma è solo dalla fine del 1800 che in Italia si avvia la sua produzione industriale a partire dal succo di limone che tra l'altro è sempre stata molto complessa.

Nel frattempo qualcuno aveva scoperto che la muffa *Penicillium* era in grado di produrlo a partire dallo zucchero.

Ma fu solo nel 1917 che il chimico americano James Currie inaugurò il percorso definitivo con i suoi studi sull'*Aspergillus niger* che era in grado di produrlo con maggiore efficienza.

# Acido citrico

Due anni più tardi l'industria farmaceutica Pfizer iniziò a produrre l'acido citrico con il metodo biotecnologico ideato da J. Currie. Al giorno d'oggi ne vengono prodotte più di un milione di tonnellate.

Agenti microbici: **Aspergillus niger** o **lieviti** (per lo più genere *Candida*), aerobi stretti e mesofili, produttori di amilasi.

Terreni coltura: **melasso** da barbabietola o canna da zucchero (fonte di saccarosio), **amido di mais** (fonte di glucosio); entrambi devono essere miscelati con acqua e il tutto sterilizzato a differenza di quanto abbiamo visto riguardo all'acido lattico.

# Acido citrico

Inoculo: si parte dalle **spore di *Aspergillus niger* che vengono fatte germinare su melasso** fino a far formare il micelio sotto forma di dischetti con diametro inferiore al millimetro (fase di prefermentazione). L'operazione è facilitata dall'aggiunta di ioni cianuro; è un momento delicato dell'intero processo perché un micelio filamentoso, poco ramificato e quindi poco compatto non dà risultati soddisfacenti.

A questo punto si passa il micelio all'interno del bioreattore dove è già presente il terreno di coltura sterilizzato.

# Acido citrico

Processo: **batch**, *sommerso* e in reattori STR di tipo air-lift (80% della produzione mondiale), altrimenti in *superficie* (processo ormai abbandonato perché costoso).

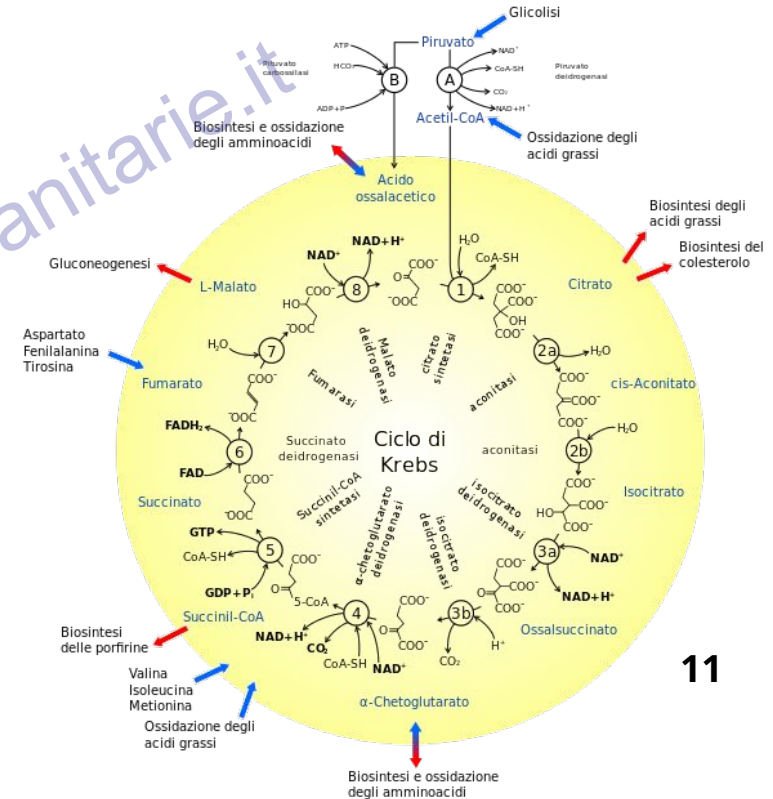
pH: **acido**, diverso a seconda del tipo di produzione (in superficie o sommerso); durante il processo viene aggiunta ammoniaca (fonte di azoto) che contribuisce anche a mantenere basso il pH.

Temperatura: **27 - 33°C**.

Tempo: da **4 a 8 - 10 giorni** in cui si assiste alla produzione sia nella trofofase che nella idiofase.

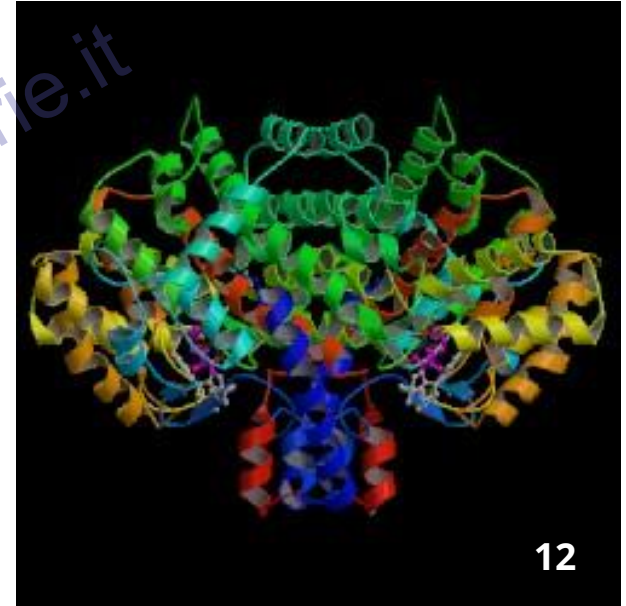
# Acido citrico

Vediamo ora alcuni particolari importanti ai fini del processo industriale che derivano dal fatto che l'acido citrico è un prodotto intermedio del ciclo di Krebs. L'acido citrico, sotto forma di citrato, deriva dalla condensazione dell'ossalacetato con l'acetil-CoA ad opera dell'**enzima citrato-sintasi**.



# Acido citrico

L'enzima citrato-sintasi ha una struttura quaternaria con due subunità ad ognuna delle quali si possono legare le due molecole coinvolte. La reazione è altamente esoergonica e quindi rende questo passaggio praticamente irreversibile.

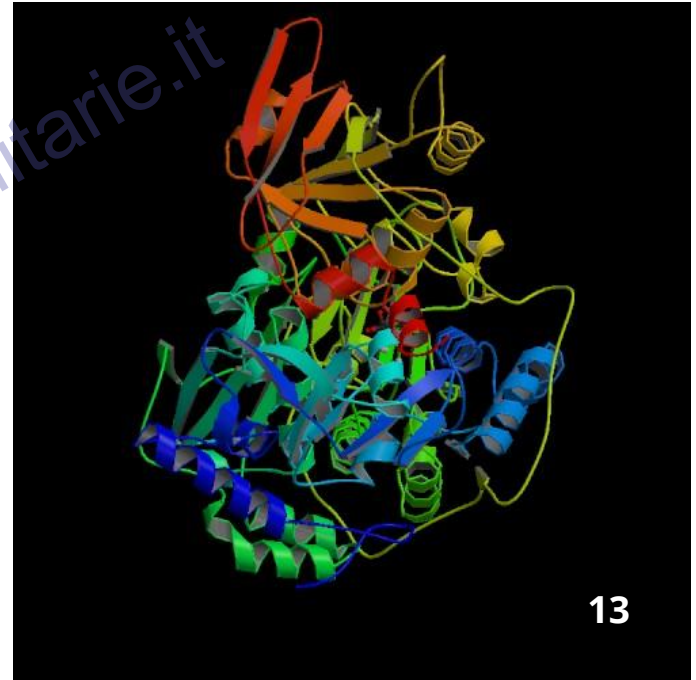


A ogni monomero della citrato sintasi sono legati una molecola di ossalacetato (magenta) e una di un analogo dell'acetil-CoA (bianco)



# Acido citrico

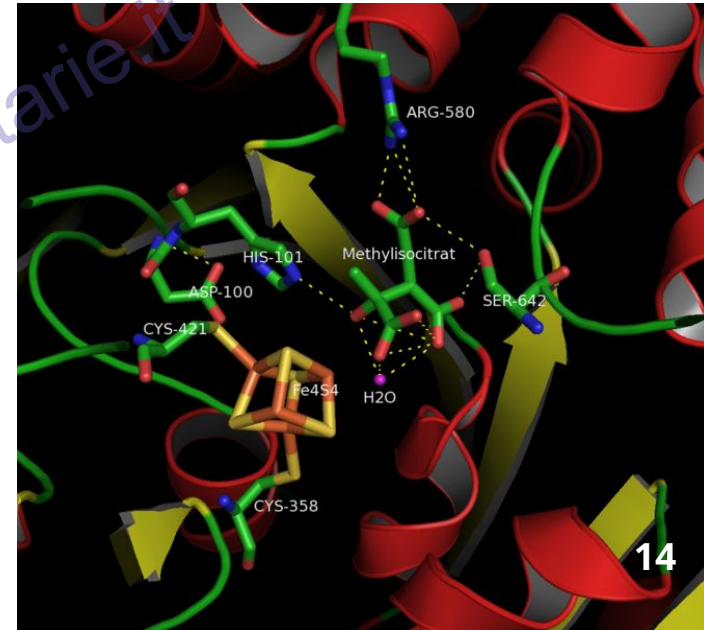
A questo punto ciò che interessa il processo sarebbe già pronto ma in qualche modo bisogna interrompere il processo altrimenti verrebbe consumato nei passaggi successivi. Quindi bisogna inibire dall'esterno l'**aconitasi**, l'enzima che trasforma l'acido citrico in acido cis-aconitico, da cui poi per addizione di acqua si ottiene l'acido isocitrico.



Enzima aconitasi

# Acido citrico

L'immagine mostra un dettaglio dell'enzima aconitasi in cui viene evidenziato il **cluster ferro-zolfo** che, insieme ad alcuni residui aminoacidici, lega il substrato. L'attività dell'aconitasi è incentivata dalla presenza di ferro. Quindi bisogna trattare il terreno di coltura con ferrocianuro prima dell'avvio del processo per far precipitare i metalli pesanti.



Dettaglio del legame tra citrato (qui rappresentato da un analogo), *cluster ferro-zolfo* ed alcuni amminoacidi

# Acido citrico

Inoltre bisogna anche controllare l'acqua spesso ricca di ferro.

Gli ioni di rame inibiscono l'aconitasi e facilitano l'accumulo di acido citrico. Quindi si può agire addizionando questi.

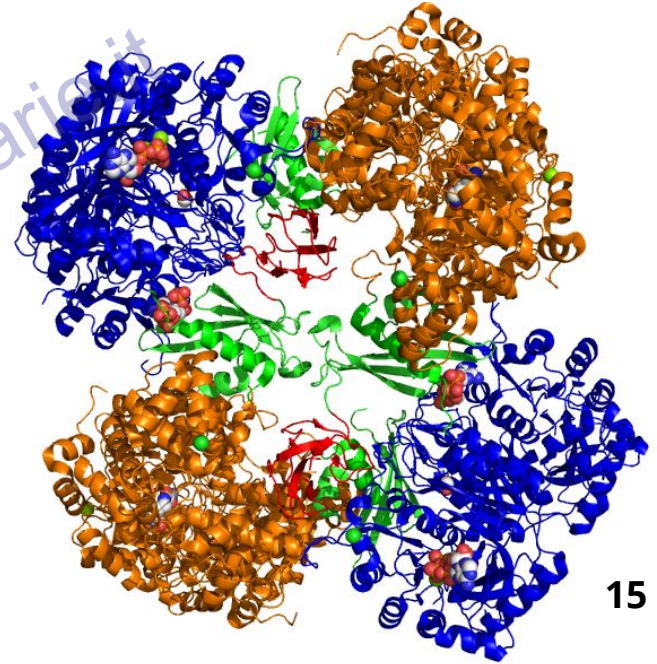
Un altro metodo riguarda l'aggiunta di EDTA (acido etilendiamminotetracetico) che sequestra il ferro, cofattore dell'aconitasi.

Ma c'è un altro problema di cui tenere conto per quanto riguarda l'*Aspergillus niger*. Vediamolo nella prossima slide.

# Acido citrico

Il problema è un enzima e si chiama **piruvato-carbossilasi** (nell'immagine la cristallografia della molecola).

L'enzima interviene a monte del ciclo di Krebs quando viene bloccata l'aconitasi come avviene nel processo industriale. L'enzima converte direttamente l'acido piruvico e la  $CO_2$  in ossalacetato e quindi blocca la formazione del citrato.



15

# Acido citrico

Si devono quindi tenere sotto controllo molti parametri diversi ma l'importante è avere sempre un'alta concentrazione di saccarosio (intorno al 22%) che garantisce un'alta resa.

Al termine del processo il prodotto finale comprende:

- la massa microbica
- il terreno esausto
- una miscela di acido citrico e ossalico

# Acido citrico

## Downstream

- **Aggiunta di latte di calce:** serve a far precipitare l'eventuale acido ossalico presente
- **Filtrazione:** si filtra il micelio
- **Aggiunta di  $\text{CaCO}_3$**  secondo questa reazione  
 $\text{CaCO}_3 + \text{Acido citrico} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{Citrato di Calcio}$   
Il citrato di calcio è disperso ancora in acqua in cui sono presenti sali, zuccheri, contaminanti ...
- **Trattamento con acido solforico:** si libera l'acido citrico e precipita il solfato di calcio
- **Purificazione, concentrazione, cristallizzazione ed essiccazione**

# Acido citrico

A questo punto è lecito chiedersi come abbiamo fatto prima a proposito dell'acido lattico: quali sono gli utilizzi dell'acido citrico?

**Industria farmaceutica (10%): stabilizzante** di farmaci (es. antiossidante delle vitamine), **additivo** (effervescente nei sali) e **conservante** per il plasma perché anticoagulante

**Industria chimica (15%): ritardante** l'indurimento del cemento, **complessante** nel settore tessile, **additivo** nelle vernici, **sostituto dei fosfati** nei detersivi (sequestratore di durezza) in cui aiuta a rimuovere il calcare

# Acido citrico

Industria alimentare (75%):

- **riduttore del grado di dolcezza;**
- **correttore del pH;**
- **antiossidante** (noto con la sigla E330, la sua azione è legata al fatto che impedisce ai metalli di funzionare da catalizzatori nei processi di auto-ossidazione);
- **acidulante** (in bevande, gelatine, marmellate ...);
- **conservante** dal momento che è un antiossidante.

Non è specificata una DGA ma una manipolazione eccessiva può causare irritazione.



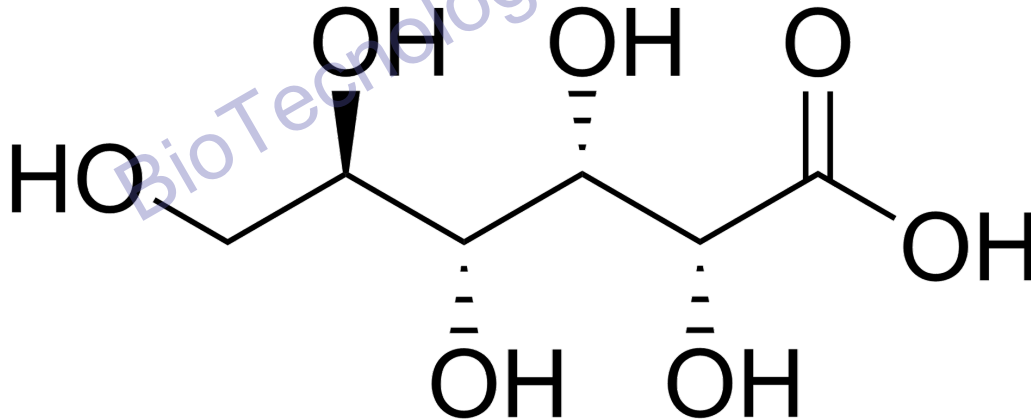


# Acido gluconico

BioTecnologieSanitarie.it

# Acido gluconico

**Acido gluconico** Si tratta di una molecola formata da una catena di 6 atomi di carbonio di cui 5 sono legati ad altrettanti gruppi ossidrilici mentre il sesto è legato ad un gruppo carbossilico.



# Acido gluconico

La molecola è presente in natura nella frutta, nel miele e nel vino. Diverse sono le utilizzazioni.

**Industria alimentare:** è un **additivo** e serve a regolare l'acidità, come  $\delta$ -lattone è un **agente lievitante** istantaneo (E575)

**Industria chimica:** **prodotti per la pulizia** (per esempio sotto forma di gluconato di sodio è un sequestrante di calcio)

**Medicina:** il gluconato di calcio viene usato per curare le ustioni da HF.

# Acido gluconico

Il processo ha una resa molto alta perché non è collegato alla crescita microbica in quanto i microrganismi sono solo dei biocatalizzatori ed eliminano il prodotto direttamente nell'ambiente extracellulare.

I protagonisti sono: *Aspergillus niger* oppure *Gluconobacter suboxydans*

L'enzima responsabile (glucosio-ossidasi) si trova ad esempio nella parete cellulare del fungo.

# Acido gluconico

Il batterio e il fungo hanno solo bisogno di una fonte di glucosio.

Dopodiché il loro enzima glucosio-ossidasi agisce sul suo substrato



I microbi sono mesofili ed agiscono a pH intorno a 6,5

# ETANOLO



BioTechnologySanitarie.it

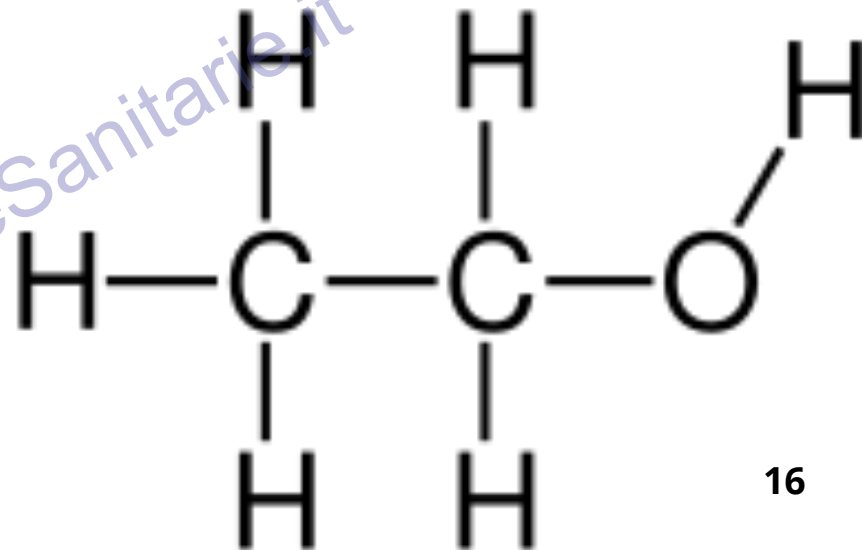
# Etanolo

**Etanolo** Ecco la sua formula di struttura condensata:



A temperatura ambiente si presenta come un liquido incolore, con un caratteristico odore pungente e gusto dolciastro e bruciante.

È volatile e molto infiammabile.

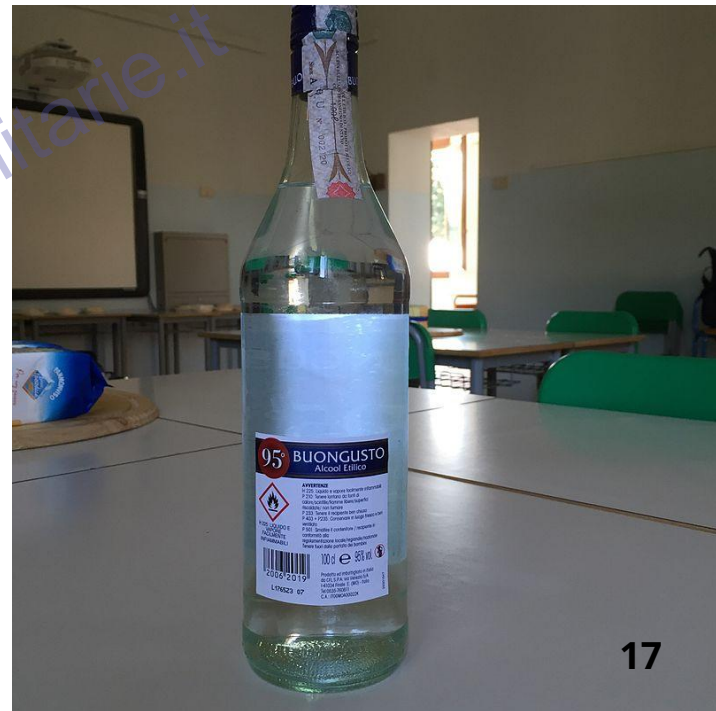


# Etanolo

È prodotto in natura per **fermentazione naturale degli zuccheri** contenuti in frutta o cereali.

Basti pensare alla produzione di birra e vino che sono note all'uomo fin da migliaia di anni fa.

Ed è l'unico alcool commestibile. Il suo contenuto nelle bevande può variare moltissimo.





# Etanolo

Le birre ne contengono mediamente dal 4 al 10% con rare eccezioni per valori superiori.

I vini raggiungono gradazioni più alte con un tenore medio del 12-13%.

I liquori e gli amari hanno percentuali fino al 40%. I distillati fino al 70% e oltre. E poi per completare l'elenco ricordiamo che cocktail e miscugli alcolici vari possono avere valori molto variabili.



# Etanolo

Altro utilizzo nell'**industria cosmetica**.  
Per esempio nella realizzazione di profumi.

Nell'**industria farmaceutica** va ricordato nella produzione di medicinali e antisettici. Da sottolineare l'azione battericida ma solo sulle forme vegetative dei batteri e non sulle spore.



# Etanolo

In **laboratorio** lo utilizziamo nella colorazione Gram per la fase di decolorazione.

Ed è solvente e materia prima in molte sintesi chimiche. Ad esempio è il precursore di acetaldeide, etilene ed acido acetico.

Viene usato nella **lucidatura dei mobili**.

E per finire è utile nella preparazione delle **vernici**, per esempio la gommalacca o la sandracca.

# Etanolo

In molti paesi del mondo viene usato come **carburante al posto della benzina**. In Brasile per esempio se ne produce in grande quantità per alimentare il motore Flex brevettato dalla FIAT. E quindi non è raro trovare i distributori di etanolo, o meglio di bioetanolo.



Distributore di bioetanolo a San Paolo, Brasile

# Etanolo

Il fenomeno non è limitato al Brasile. La foto mostra una Ford Taurus alimentata a bioetanolo in una strada di New York.

Può essere utilizzato puro solo nei motori Flex già citati e negli altri miscelato alla benzina fino al 40%.



# Etanolo

Sempre come **combustibile** alimenta i biocamini o biostufe.

Si sfrutta così il potere calorifico per riscaldare gli ambienti.

Per il corretto funzionamento bisogna avere un'adeguata canna fumaria che espella verso l'esterno i gas di scarico e la struttura deve essere sicura data l'alta infiammabilità.



# Etanolo

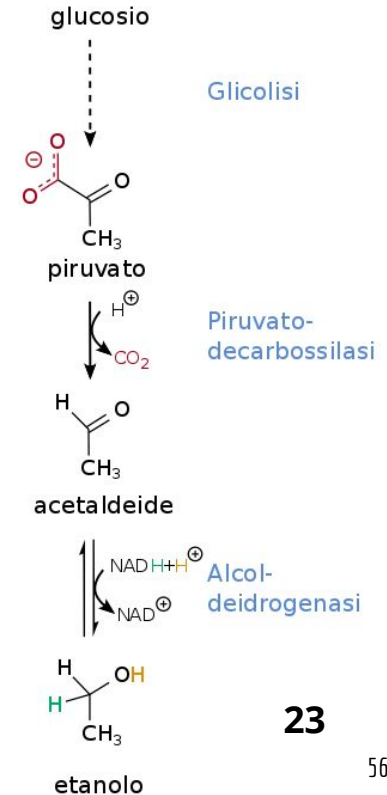
Da dove è nata l'idea di studiare il modo di produrlo sfruttando le vie metaboliche naturali? e di ottenere così il bioetanolo?

Senza dubbio la crisi energetica con l'aumento dei costi dei carburanti e la prospettiva di avere nel futuro sempre meno disponibilità di fonti energetiche fossili ha stimolato le ricerche. A queste considerazioni bisogna aggiungere anche la spinta a minori sprechi e ad utilizzare molti scarti di lavorazioni a partire dall'agricoltura ma non solo.



# Etanolo

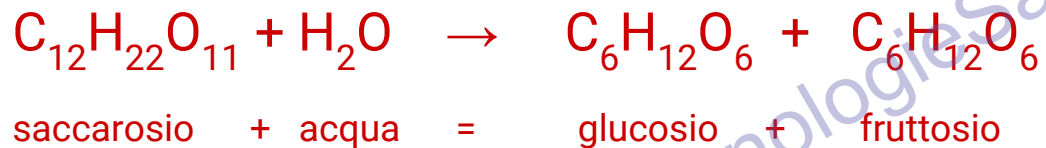
Per capire meglio l'intero processo biotecnologico partiamo dalla **fermentazione alcolica** che produce alcol e anidride carbonica a partire dagli zuccheri in assenza di ossigeno. In natura sono essenzialmente i lieviti che la portano a termine e tra questi il più diffuso è senza dubbio *Saccharomyces cerevisiae*. Il microrganismo deve prima procedere a idrolizzare gli zuccheri a sua disposizione.



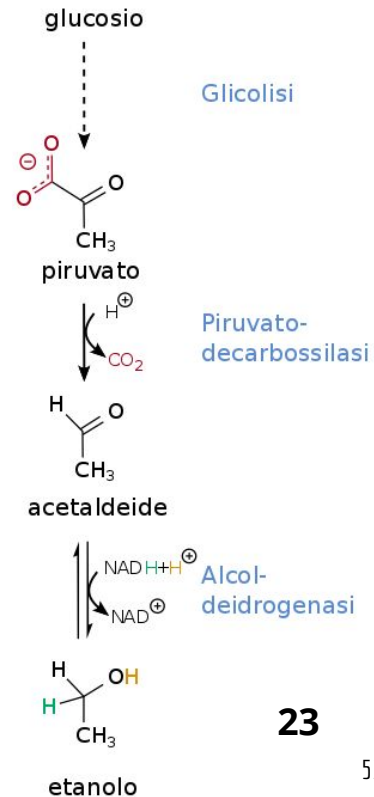
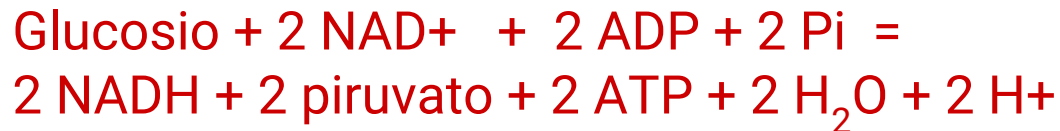


# Etanolo

In genere si tratta di saccarosio e per trasformarlo nei suoi due componenti, glucosio e fruttosio, utilizza l'enzima invertasi.



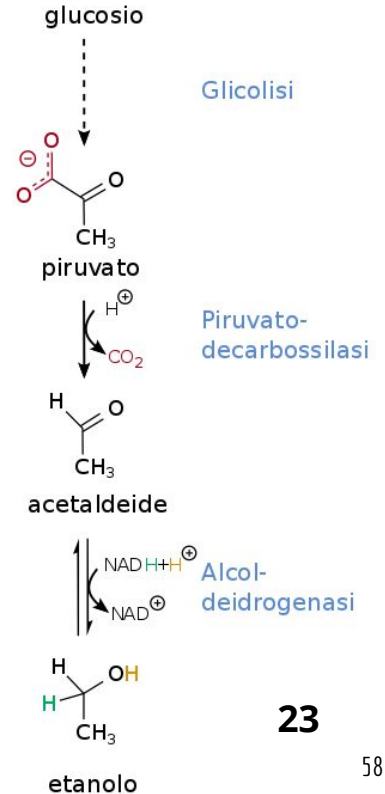
A questo punto inizia la **glicolisi**. Dal glucosio, nel citoplasma, si originano due piruvati.



# Etanolo

Come abbiamo già visto, in assenza di ossigeno, e con il NADH che deve essere rigenerato in NAD<sup>+</sup> per consentire successive glicolisi di altre molecole di glucosio, **la via scelta è quella fermentativa.**

Lo schema ci aiuta a seguire i passaggi. Dal piruvato si ottiene l'acetaldeide grazie all'intervento della *piruvato-carbossilasi*. L'acetaldeide si trasforma in etanolo per l'intervento dell'*alcol deidrogenasi*.



# Etanolo

Complessivamente si può scrivere.

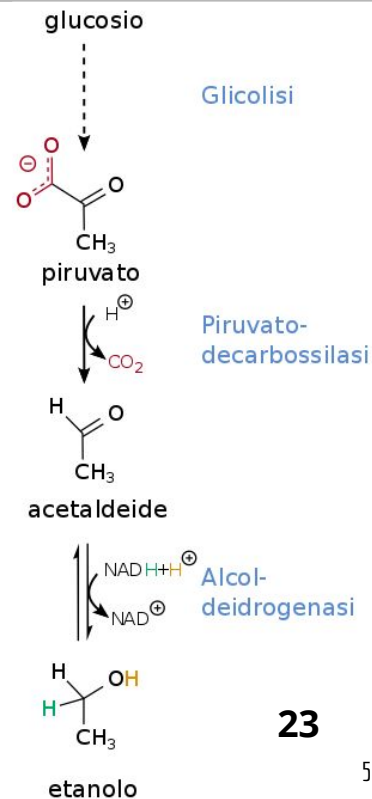


glucosio

etanolo

anidride carbonica

La stessa sequenza di reazioni avviene nel processo biotecnologico che porta alla produzione del bioetanolo che però deve essere studiato attentamente per migliorare l'azione dei microrganismi e tamponare alcuni problemi.



# Etanolo

Cominciamo dai **microrganismi scelti**.

Oltre a Saccharomyces cerevisiae, si utilizza anche Saccharomyces carlsbergensis e specie dei generi Schizosaccharomyces, Candida e Kliveromyces.

Inoltre recentemente sono stati inseriti nella linea produttiva anche batteri termofili come Zymomonas mobilis.

Questi ultimi offrono molti vantaggi perché crescono più velocemente, producono etanolo in maggiore quantità e più rapidamente e dimostrano una maggiore resistenza ad alte concentrazioni di etanolo.

# Etanolo

Infatti l'**alcol-tolleranza** è un fenomeno che deve essere sempre preso in considerazione. Bisogna ricordare che l'alcol riesce a passare facilmente attraverso la membrana cellulare grazie alla sua struttura e quindi può provocare variazioni di permeabilità fino a causare fuoriuscite di materiale citoplasmatico e morte cellulare. La diffusione è correlata alla composizione in acidi grassi insaturi della membrana. Sembra che nel caso di *Zymomonas mobilis* l'abbondanza di acidi grassi insaturi e di opanoidi possa spiegare quanto detto prima, cioè la velocità di azione e di resa.

# Etanolo

Zymomonas ha però esigenze nutritive notevoli e questo è un limite al suo uso.

L'alcol-tolleranza riguarda a maggior ragione i lieviti; il problema si manifesta con concentrazioni di etanolo superiori al 10% e può essere aggirato o riducendo la temperatura o aggiungendo piccole quantità di ossigeno o un po' di vitamine.

Bisogna stare molto attenti nell'aggiungere l'ossigeno. Non bisogna dimenticare l'effetto Pasteur.

# Etanolo

L'effetto Pasteur indirizza il metabolismo di un lievito da respiratorio-ossidativo a fermentativo in carenza di ossigeno ma è in grado di condizionare il microrganismo anche in senso contrario.

D'altra parte, sempre a proposito dell'ossigeno, c'è da tenere presente un altro particolare; se i lieviti sono lasciati senza ossigeno per 3 o 4 generazioni, cominciano ad avere problemi. Non riescono più a sintetizzare alcuni componenti strutturali delle membrane cellulari e questo aggrava l'alcol-tolleranza.

# Etanolo

Insufflare troppo ossigeno può far deviare il processo fermentativo e ridurre la produzione, allora in qualche caso per rimediare a queste serie di problemi, si preferisce arricchire il substrato di steroli e acidi grassi.

Questo ragionamento conferma che ogni processo biotecnologico è molto complesso e richiede personale decisamente competente.

Da non dimenticare poi l'effetto Crabtree già citato in questa presentazione.



# Etanolo

Passiamo ai terreni di coltura.

Nel trattare all'inizio questo argomento è stato messo in evidenza come una delle motivazioni più forti sia stato l'utilizzo di scarti industriali o agricoli che abbassano i costi di produzione ed evitano gli sprechi.

Di conseguenza troveremo le melasse, lo sciroppo di glucosio prodotto mediante idrolisi dall'amido di mais, il siero di latte. Ultimamente c'è interesse anche per i residui della lavorazione del legno.

# Etanolo

Per poter utilizzare i materiali cellulosici si deve ricorrere:

- a trattamenti chimici con acidi forti
- ad enzimi di origine microbica (*Aspergillus niger*)

In ogni caso bisogna tritularlo finemente fino ad ottenere un miscuglio su cui inoculare i microbi che producono cellulasi. Microbi che a loro volta devono essere preventivamente fatti crescere su terreni arricchiti.

# Etanolo

Il terreno deve essere sterilizzato ma piuttosto che le alte temperature si preferisce un breve trattamento a 80°C (pastorizzazione) per evitare di provocare decomposizione degli zuccheri.

Particolare attenzione deve essere posta al pH che viene mantenuto acido tra 4,5 e 4,7 per allontanare il rischio di contaminazione e migliorare comunque la resa.

Anche la temperatura non si fa salire oltre i 35°C perché è vero che aumentarla significherebbe maggiori rese produttive ma contemporaneamente si riproporrebbe il problema dell'alcol-tolleranza.

# Etanolo

Queste le tappe principali del processo produttivo.

- Inoculo con il ceppo microbico scelto dopo le fasi di scale-up
- Uso di un bioreattore STR in continuo perché consente di ridurre i tempi morti e di aumentare la produttività. Il processo ha però il problema della tossicità dell'alcol che si ritrova alla stessa concentrazione dell'effluente in tutti i punti; lo si può superare mettendo in serie più bioreattori. I microrganismi vengono immobilizzati in sospensione.

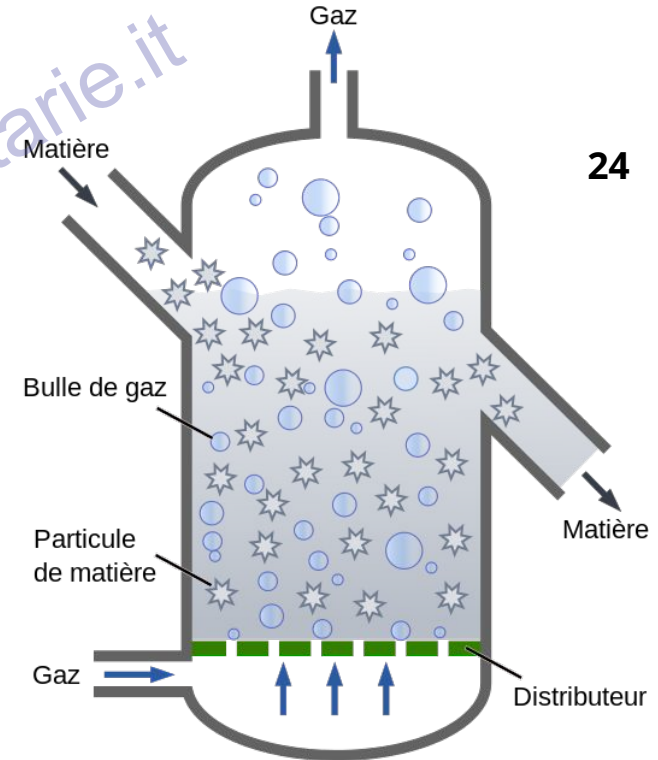
# Etanolo

Queste le tappe principali del processo produttivo.

- Inoculo con il ceppo microbico scelto dopo le fasi di scale-up
- Uso di un bioreattore STR in continuo perché consente di ridurre i tempi morti e di aumentare la produttività. Il processo ha però il problema della tossicità dell'alcol che si ritrova alla stessa concentrazione dell'effluente in tutti i punti; lo si può superare mettendo in serie più bioreattori. I microrganismi vengono immobilizzati in sospensione.

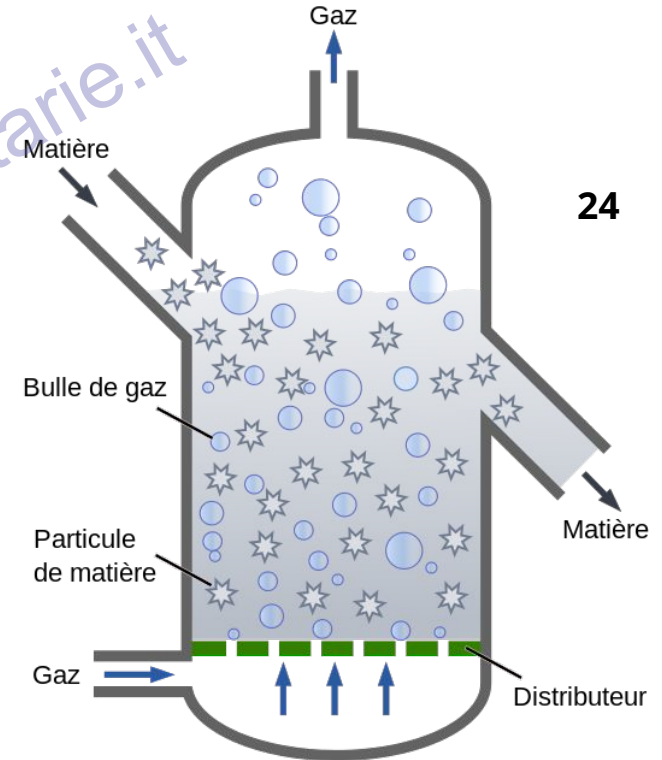
# Etanolo

- Un'altra possibilità, sempre riguardo al bioreattore, è la scelta di uno a letto fluido. Il biocatalizzatore viene immobilizzato in sospensione su microsferi. Il bioreattore a letto fluido è molto simile ai reattori air lift.



# Etanolo

- Il letto viene allestito nella parte inferiore e le microsferine messe in agitazione. Così risalgono verso l'alto dove la loro velocità di agitazione diminuisce e quindi ricadono verso il basso.
- Downstream



# Etanolo

Il prodotto contiene non solo etanolo e quindi bisogna effettuare diversi passaggi per ottenerlo.

Prima di tutto si procede alla filtrazione per eliminare residui di massa microbica.

L'etanolo si separa per distillazione. Oltre all'alcol si ottiene una vinaccia che contiene *glicerina* e *fuseloil* (miscela di alcoli superiori, esteri, aldeidi, acidi organici ..)



# Etanolo

Impianto di produzione del bioetanolo in Sassonia - Germania



# ENZIMI



BioTechnologySanitarie.it

# Enzimi

Gli **enzimi** sono proteine specializzate nell'accelerare le reazioni chimiche nelle cellule anche di un milione di volte.

In pratica, quindi, sono dei biocatalizzatori.

Agiscono a pH e temperature ben definite.

E fin qui sono concetti noti.

In questa sezione ci interessano quelli che si ottengono attraverso processi biotecnologici e sono quindi enzimi ricombinanti. Essi hanno sostituito nel tempo quelli ottenuti per estrazione da prodotti naturali o per via sintetica.

# Enzimi nei detersivi

Per esempio molti enzimi vengono addizionati ai detersivi per lavastoviglie e lavatrici.

Si tratta di **proteasi** (rimozione di proteine), **amilasi** (rimozione dell'amido), **cellulasi** (solo per il lavaggio di tessuti) e **lipasi** (il più possibile termostabili date le temperature di lavaggio).



# Enzimi nei detergenti

I diversi detergenti usati per lavare pentole, stoviglie o indumenti riescono a rimuovere fino ad una certa percentuale di sporco. Quello che rimane viene attaccato dagli enzimi, in genere presenti in miscele, che lo suddividono in particelle più piccole e completa il compito. La presenza di enzimi:

- velocizza il lavaggio
- consente di usare temperature più basse
- quindi fa risparmiare energia

# Enzimi nei detergenti

- riduce il consumo di acqua
- tutela l'ambiente perché gli enzimi vengono degradati facilmente
- protegge le fibre di cotone grazie alla presenza di cellulasi

Ovviamente l'attività enzimatica, a sua volta, dipende da molti fattori tra cui la qualità dello sporco, la composizione del detergente, la durezza dell'acqua, la temperatura e la procedura di lavaggio.

# Enzimi nell'industria alimentare

Altri enzimi vengono utilizzati nell'**industria alimentare**. Le **pectinasi**, enzimi che depolimerizzano la pectina diminuendo il suo potere gelificante, in natura causano la macerazione di frutta e verdura. Quindi industrialmente vengono sfruttate nella chiarificazione dei succhi di frutta o del vino al posto del biossido zolfo. La foto mostra un succo di frutta senza polpa.



# Enzimi nell'industria alimentare

Enzimi sono usati nella produzione della birra. Stiamo parlando di **amilasi**, appartenenti alle idrolasi. Ne conosciamo di due tipi: le  **$\alpha$ -amilasi** (endoamilasi) e le  **$\beta$ -amilasi** (esoamilasi) entrambi presenti nei semi dell'orzo o di altri cereali, materia prima della birra.



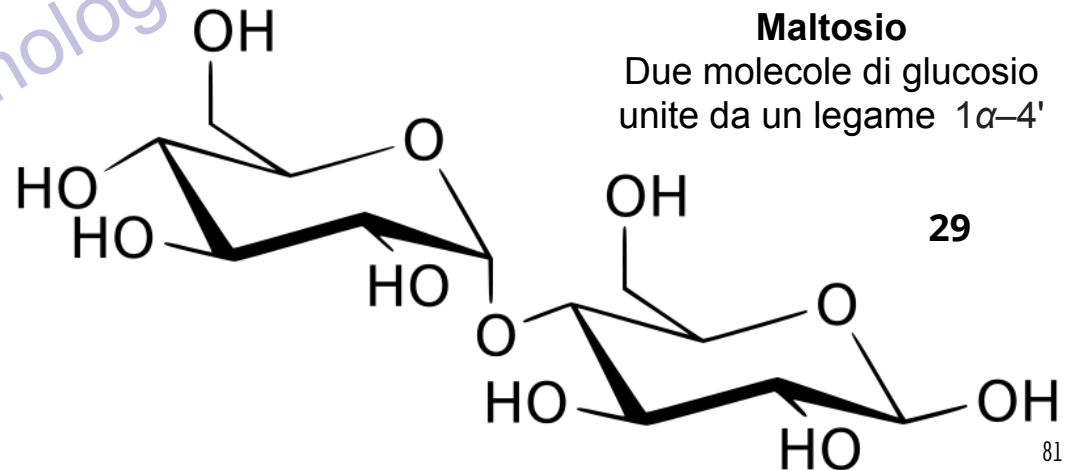
28



# Enzimi nell'industria alimentare

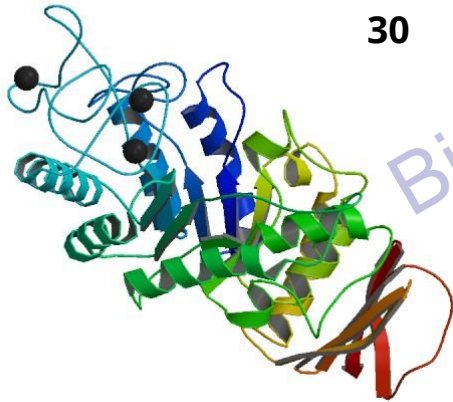
Le due amilasi degradano l'amido, prima liberando le destrine che sono polimeri a più corta catena; questi a loro volta vengono scissi in disaccaridi e poi in monosaccaridi (glucosio).

L'α-amilasi agisce a caso e produce maltosio e glucosio mentre la β-amilasi, più selettiva, solo maltosio.



# Enzimi nell'industria alimentare

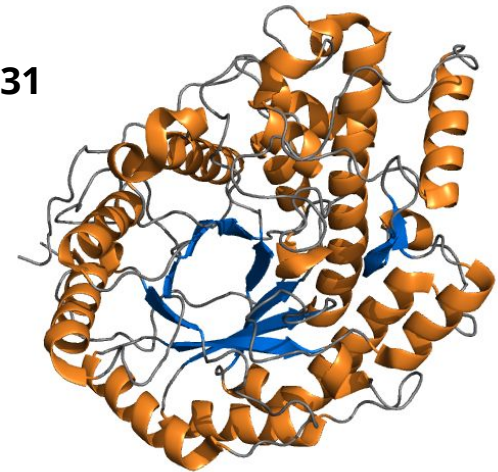
La  $\beta$ -amilasi è presente nei semi in una forma inattiva prima della germinazione, mentre l' $\alpha$ -amilasi e le proteasi compaiono una volta iniziata la germinazione.



A sinistra:  
cristallografia di **alfa-amilasi**  
dell'orzo

A destra  
Cristallografia di **beta-amilasi**  
dell'orzo

31



# Enzimi nell'industria alimentare

La prima fase della produzione della birra è appunto la germinazione dei semi di orzo e, quando compare la radichetta, le due amilasi insieme alle proteasi sono sviluppate.

La successiva torrefazione elimina la radichetta ma consente anche, a seconda della temperatura a cui si opera, di iniziare la produzione di birra chiara (70°C) o di birra scura (105°C).

# Enzimi nell'industria alimentare

La fase successiva detta ammostatura o ammostamento serve ad attivare le amilasi e a degradare l'amido a zuccheri semplici o maltosio su cui poi i lieviti possono effettuare la fermentazione alcolica.

Più dettagli nella [presentazione dedicata alla birra](#).

Altro uso delle amilasi nell'industria alimentare è nella preparazione di prodotti da forno.

L'  $\alpha$ -amilasi e la  $\beta$ -amilasi si ottengono ormai facilmente da batteri o muffe.

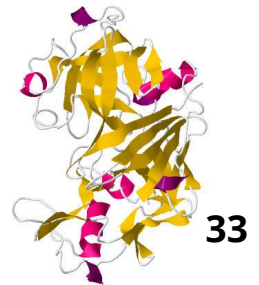
# Enzimi nell'industria alimentare

Va poi ricordato che nell'industria casearia il caglio ottenuto dall'abomaso dei ruminanti viene sostituito sempre più frequentemente da **proteasi acide** prodotte da muffe (*Rhizomucor*) o da una **chimosina** (o rennina) ricombinante ottenuta da un lievito (*Kluyveromyces*). La chimosina è una idrolasi necessaria per la digestione della caseina nel latte.



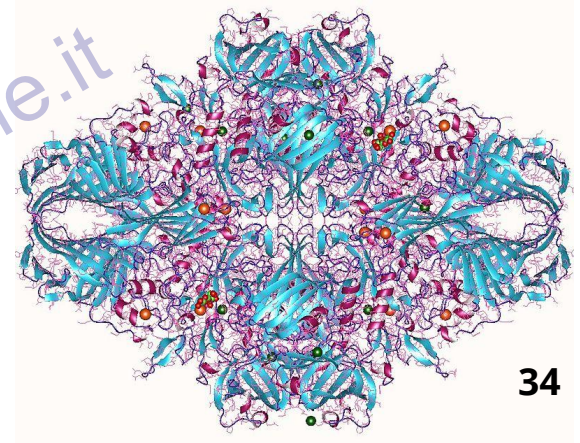
In alto: caseificio

Di lato:  
chimosina



# Enzimi nell'industria alimentare

Altro enzima molto sfruttato nell'industria alimentare è la **lattasi** o  **$\beta$ -galattosidasi** che scinde lo zucchero del latte, il lattosio, nei suoi due monomeri: glucosio e galattosio. Importante nella produzione di latte o di derivati per chi non riesce a digerire il lattosio.



34

In alto: enzima lattasi (tetramero) + 4 lattosio (aree verde-rosso) + 14 Mg + 15 Na (E. coli)  
Di lato: disegno di bottiglia di latte senza lattosio



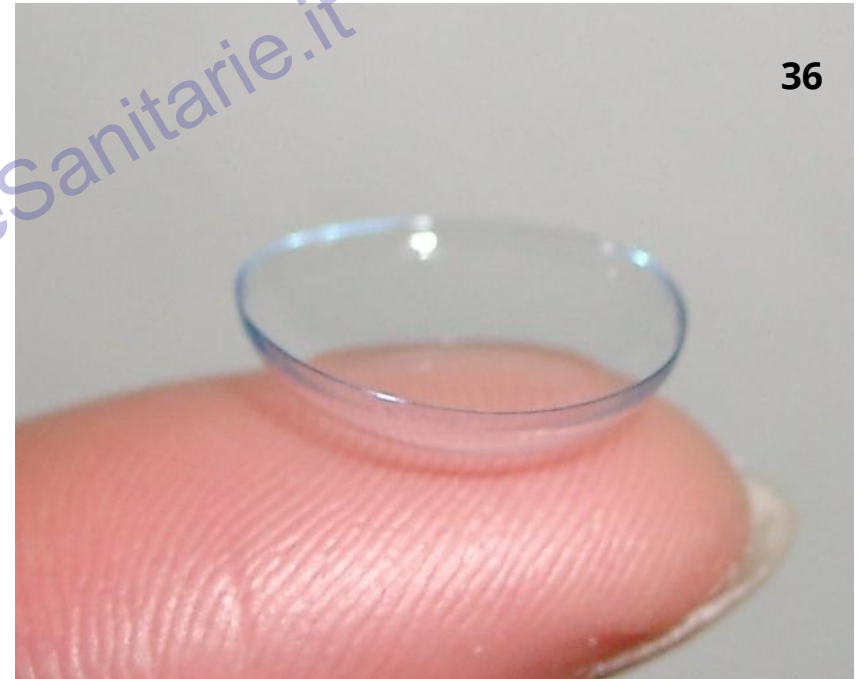
35

# Enzimi nell'industria alimentare

Completiamo la carrellata degli enzimi utilizzati nell'industria alimentare citando la **glucosio-ossidasi** che abbiamo già esaminato nella produzione dell'acido gluconico. È presente, come sappiamo, nella parete cellulare del fungo *Aspergillus niger* e ci è noto quindi anche il microrganismo che la produce. L'enzima trasforma il glucosio in acido gluconico con formazione di perossido di idrogeno. Viene utilizzato nell'industria alimentare per rimuovere l'ossigeno dalla maionese e dalla frutta sciroppata per impedirne il deterioramento e la decolorazione

# Enzimi per l'igiene

Proteasi sono utilizzate nell'igiene dentale (dentifrici) o per la pulizia di lenti a contatto (in questo caso anche la lipasi e la lattasi).





# Enzimi nell'industria tessile

Un gran numero di enzimi ingegnerizzati viene usato nei processi tessili, nelle tintorie e nelle lavanderie industriali. Questo approccio con enzimi di nuova generazione potrebbe sostituirsi in futuro sempre di più a pratiche chimiche più aggressive ed inquinanti.



# Enzimi nell'industria tessile

La **cellulasi** è tra quelle più sfruttate. Il campo di maggiore applicazione è lo “stone washing”, ovvero l'effetto consumato su tessuto di jeans (denim). Una volta si usava la pietra pomice.



# Enzimi nell'industria tessile

Altri enzimi e ne citiamo solo alcuni, sono:

- le **catalasi** che sostituiscono l'acqua ossigenata dopo il candeggio e prima della tintura;
- le **perossidasi** per le applicazioni nella detergenza e in tintoria industriale;
- la **laccasi** per l'ossidazione enzimatica di indaco;
- le **proteasi** per le operazioni sulle fibre di seta e di lana.

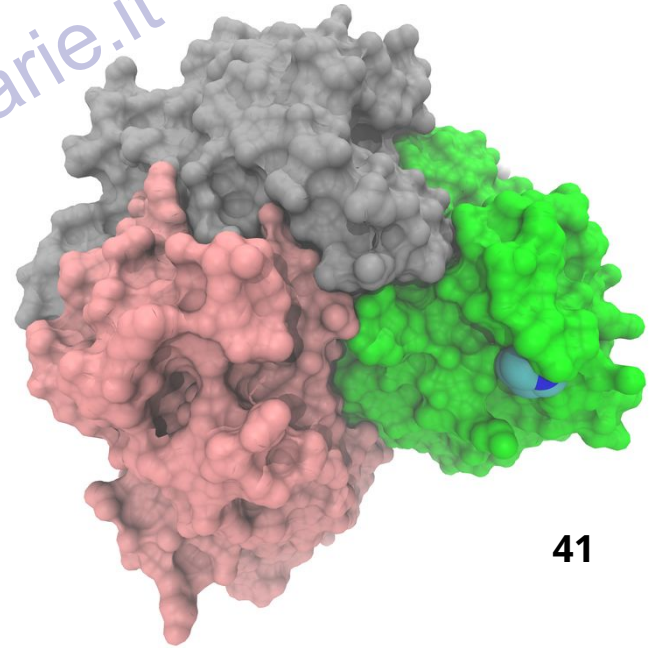
# Enzimi nell'industria conciaria

Nel settore conciario gli enzimi che trovano il maggior numero di applicazioni sono le **proteasi** e le **lipasi** che agevolano il lavoro nella produzione di cuoio e pelli in fasi specifiche come la macerazione e lo sgrassamento. Nella foto pelli finite in magazzino.



# Enzimi in medicina

Questa e la prossima slide sono dedicate ad una famiglia di enzimi molto interessanti che sono espressi e prodotti da una serie di microrganismi. Si tratta delle **asparaginasi**. Il loro ruolo è quello di trasformare l'asparagina in acido aspartico. Ma questa attività può essere esercitata a livello di industria alimentare o farmaceutica.



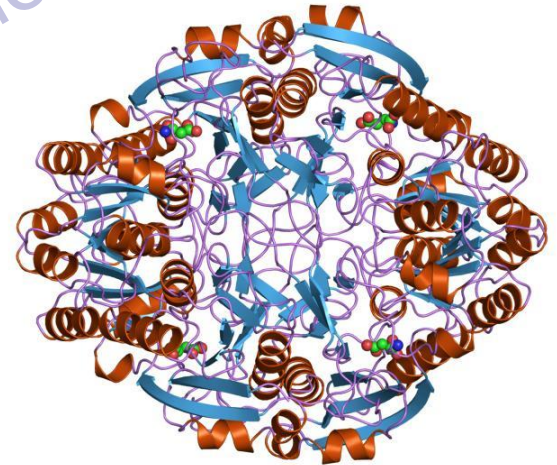
41



# Enzimi in medicina

L'enzima viene venduto alle industrie alimentari come *Acrylaway* e *PreventASe* per prevenire la formazione di acrilammide, un prodotto sospetto cancerogeno, nei cibi ricchi di amido come biscotti e snack.

Un'altra asparaginasi è venduta invece come farmaco per combattere alcune neoplasie del sangue.



# Enzimi in medicina

Sembra essere efficace nei linfomi non Hodgkin, nella leucemia mieloide acuta e nella leucemia linfoblastica acuta.

I linfomi non Hodgkin sono neoplasie a carico del tessuto linfatico che in genere si localizzano nei linfonodi e più raramente in sede extra-nodale).

La leucemia mieloide acuta è una neoplasia della linea mieloide delle cellule del sangue che vede il rapido proliferare di globuli bianchi anomali che si insediano nel midollo osseo interferendo con la normale produzione delle altre cellule.

La leucemia linfoblastica acuta è molto rara.

# Enzimi in medicina

Il nome commerciale del farmaco usato contro queste neoplasie è *Elspar*.

Viene somministrato per via parenterale.

Il suo meccanismo d'azione è correlato alla sottrazione in circolo di asparagina di cui le cellule tumorali sono affamate ma che non sono in grado di produrre a differenza delle cellule sane.

Gli effetti collaterali sono spesso pesanti e vanno dalla reazione allergica alla riduzione di sintesi di importanti proteine specifiche come fattori coagulanti o il fibrinogeno.



# Enzimi: produzione

Per quanto riguarda la produzione biotecnologica c'è da evidenziare subito una importante suddivisione.

- **Enzimi endocellulari** il cui recupero prevede la lisi delle cellule; alcuni sono idrolitici (come la penicillina-acilasi) e altri no (come la catalasi).
- **Enzimi extracellulari** che vengono prodotti direttamente nel brodo di coltura; si tratta in genere di idrolasi per la degradazione dei polimeri.
- **Enzimi di superficie**, come le maltasi e le lattasi, presenti nella parete dei lieviti.

# Enzimi: produzione

In genere per accelerare la produzione e migliorare la resa vengono **scelti i ceppi più promettenti ed ingegnerizzati** a seconda delle necessità.

La tecnologia del DNA ricombinante consente di trasferire all'interno del loro genoma il gene responsabile della sintesi di uno specifico enzima insieme al gene relativo alla sua espressione.

Senza contare che numerose specie già producono enzimi che interessano le varie industrie. Se necessario, anche in questo caso si possono fare modifiche genetiche.

# Enzimi: produzione

I **terreni di coltura** devono fornire tutte le fonti di carbonio e azoto, fattori di crescita e vitamine necessarie per lo sviluppo microbico. Anche per questo tipo di produzione vengono scelti sottoprodotti di altre lavorazioni per non incidere sui costi.

**Temperatura e pH** vengono fissati nel range ottimale per il batterio o il fungo scelti.

Le **culture** possono essere in liquido o semisolide

# Enzimi: produzione

Nelle colture in liquido vengono prodotti sia gli enzimi extracellulari che quelli endocellulari. Per queste ultime si deve procedere alla lisi cellulare e l'enzima si ottiene dal surnatante. Anche l'enzima extracellulare si trova direttamente nel surnatante.

Le colture semisolide sono preferite per gli enzimi extracellulari. L'enzima va separato dalle cellule produttrici in ogni caso e alla fine si trova nel surnatante.

Dal surnatante si parte per i successivi processi di downstream.

# Enzimi: produzione

**Preparazione liquida.** Il surnatante è concentrato e stabilizzato.

**Preparazione in polvere.** Il surnatante viene sempre concentrato, purificato ed essiccato.

BioTechnologieSantorie.it

# Enzimi: produzione

Vediamo ora una rapida rassegna dei **principali microrganismi coinvolti** nelle produzioni biotecnologiche.

Microbo	Enzimi prodotti
Aspergillus niger	glucosio-ossidasi, lattasi, pectinasi, lipasi
Aspergillus oryzae	alfa-amilasi, lattasi, proteasi neutre
Rhizomucor (muffa)	proteasi acide
Kluyveromyces (lievito)	chimosina (detta anche rennina) ricombinante

# Enzimi: produzione

Vediamo ora una rapida rassegna dei principali microrganismi coinvolti nelle produzioni biotecnologiche.

Microbo	Enzimi prodotti
Escherichia coli (mutante)	asparaginasi
Bacillus subtilis	alfa-amilasi
Bacillus licheniformis	alfa-amilasi, proteasi alcaline, lipasi

# AMMINOACIDI



BioTechnologie Sanitarie.it



# Amminoacidi

Gli **amminoacidi** hanno un notevole commercio a livello mondiale sia come integratori dell'alimentazione umana che di quella animale. Vengono anche utilizzati a scopo terapeutico e per aromatizzare i cibi.

Prima dell'avvento della microbiologia industriale venivano isolati per idrolisi di proteine vegetali, soprattutto da grano e soia o ottenuti per sintesi chimica.

Le fermentazioni in reattori sono molto più convenienti e danno una resa maggiore.

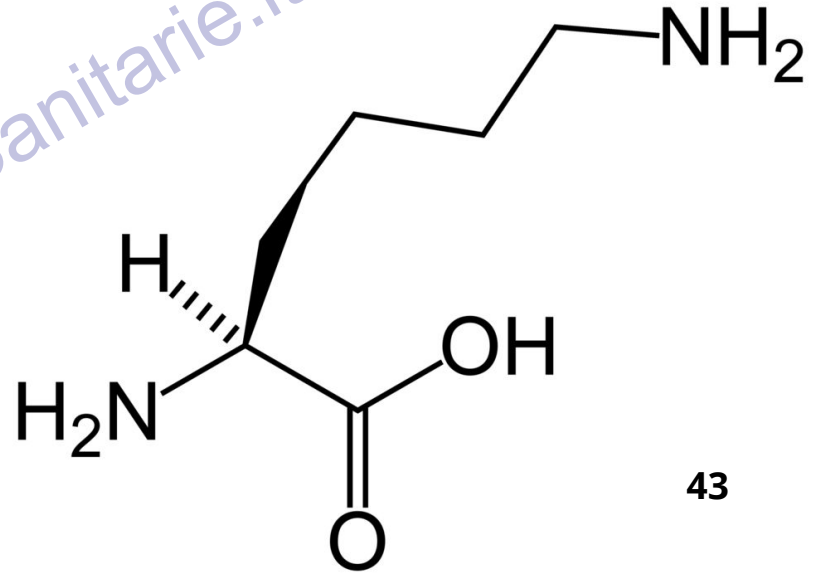
# Amminoacidi

Inoltre c'è un altro importante vantaggio: la produzione a partire da elementi cellulari consente di ottenere le forme L, le uniche biologicamente attive. In questo discorso non rientra la metionina perché entrambe le forme L e D sono attive. La sintesi chimica invece origina miscele racemiche di entrambe le forme.

Dal punto di vista commerciale due sono gli amminoacidi più importanti e richiesti: la L-lisina e l'acido glutammico.

# Amminoacidi: L-lisina

Le richieste commerciali di **L-lisina** riguardano il suo ruolo di integratore e di additivo alimentare. L'amminoacido, essenziale, in genere viene aggiunto alla farina. L'80% delle richieste di mercato sono soddisfatte dalla fermentazione mentre il 20% si ricava per via sintetica.

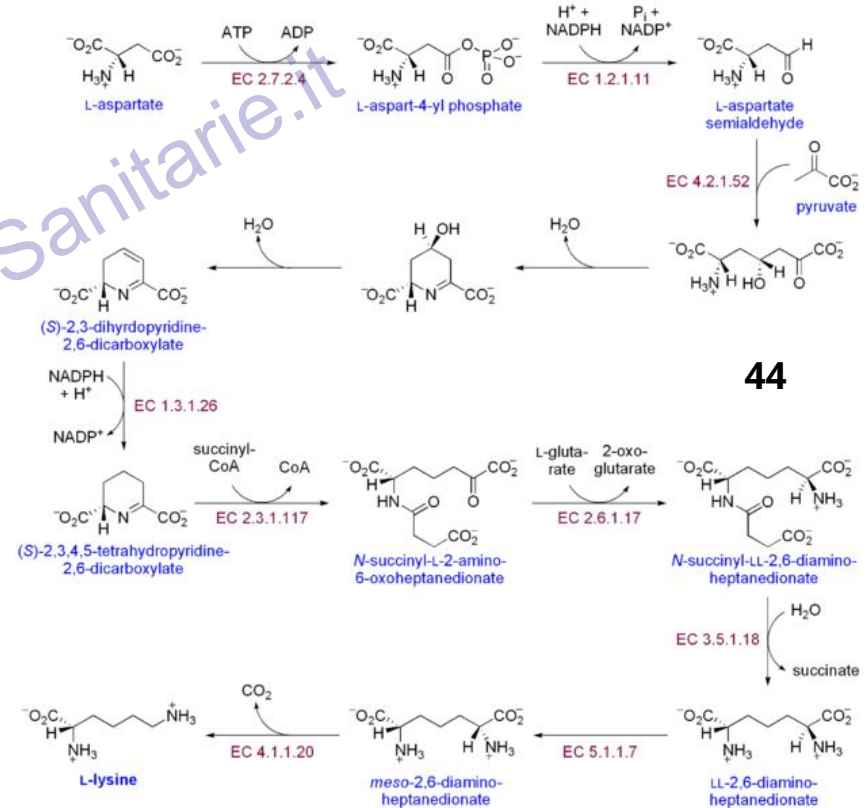


43

# Amminoacidi: L-lisina

Sono due i percorsi biosintetici applicati nelle fermentazioni.

1. Percorso DAP o dell'intermedio acido diaminopimelico (nell'immagine)
2. Percorso AAA o dell'intermedio  $\alpha$ -amino adipato



# Amminoacidi: L-lisina

**Percorso DAP** (batteri, alghe, piante)

Piruvato + Aspartato

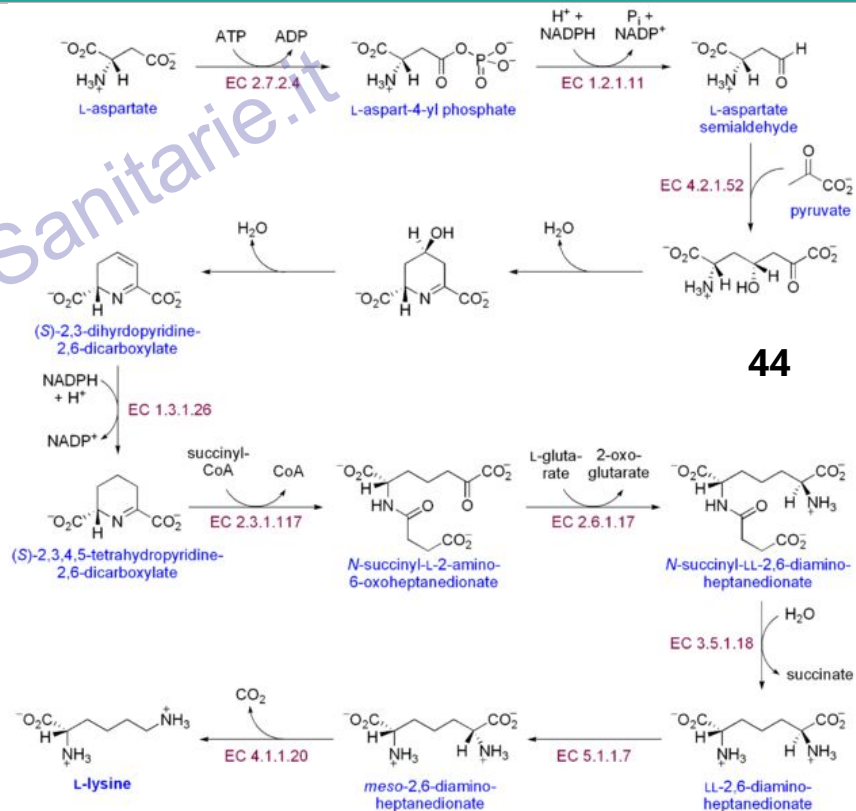


**DAP**

(acido diaminopimelico)



**Lisina**



# Amminoacidi: L-lisina

**Percorso AAA** (funghi, euglenoidi)

Acetato +  $\alpha$ -chetoglutarato



AAA

( $\alpha$ -amino adipato)



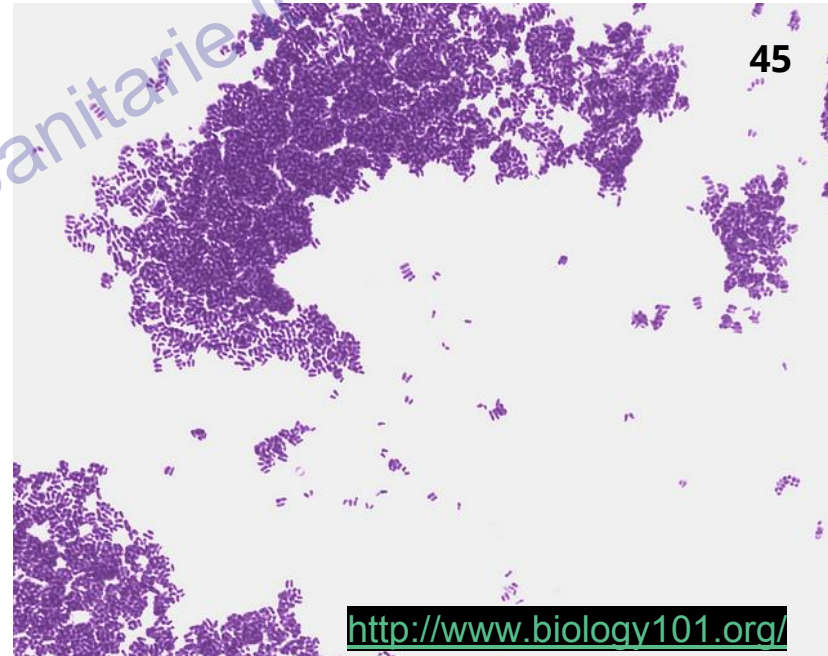
Lisina

BioTecnologieSanitarie.it

# Amminoacidi: L-lisina

Il batterio utilizzato nel DAP è un ceppo mutato di **Corynebacterium glutamicum** (nell'immagine, vista al microscopio a 1000x).

Nel batterio originario la L-lisina rappresenta uno dei prodotti terminali in seguito alla metabolizzazione del glucosio. Peccato che insieme alla lisina il batterio produca anche L-treonina e L-metionina.



# Amminoacidi: L-lisina

Perché peccato?

Se la lisina e la treonina sono presenti in eccesso il processo metabolico si arresta. Al contrario se uno dei due è assente tutto procede regolarmente indipendentemente dalla concentrazione dell'altro aminoacido.

Su questa caratteristica si è lavorato per isolare un ceppo mutato di *C. glutamicum* che sia in grado di produrre lisina ma non metionina e treonina. Gli aminoacidi mancanti però devono essere aggiunti al terreno di coltura. Se la quantità di treonina aggiunta è minima il ceppo mutato del batterio produce L-lisina in grande quantità.



# Amminoacidi: L-lisina

**Upstream** (ciclo di 100 ore)

Processo: **batch** o **fed-batch**, in coltura sommersa e in bioreattore STR ad agitazione air-lift

Terreno di coltura: **melassa** addizionata di fonti di azoto, sali minerali e agenti antischiuma

pH: **neutro** (optimum intorno a 7,2)

Temperatura: **35 - 37°C**

# Amminoacidi: L-lisina

## Downstream

1. Centrifugazione e filtrazione (*per eliminare solidi in sospensione e detriti cellulari*)
2. Trattamento con resine a scambio ionico (*per isolare e purificare il prodotto*) Per maggiori dettagli sulle resine a scambio ionico vedere la prossima slide.
3. Concentrazione e filtrazione (*della soluzione che si ottiene*)
4. Cristallizzazione ed essiccazione

# **APPROFONDIMENTO**

## **Resina a scambio ionico**

BioTechnologySanitarie.it

# Resina a scambio ionico

## Resina a scambio ionico

È costituita da una matrice insolubile che agisce come mezzo per lo scambio ionico. In pratica la matrice è sotto forma di granuli con raggio variabile da 0,25 a 0,5 mm.



Pellet di resina a scambio ionico

46

# Resina a scambio ionico

Nei granuli, in genere bianchi o giallastri che si ottengono da un polimero organico (il più usato è il polistirene), sono intrappolati o inglobati ioni (cationi o anioni) utilizzati per lo scambio ionico. I granuli sono porosi ed offrono una grande superficie sia all'esterno che all'interno.



# Resina a scambio ionico

La resina a scambio ionico è utilizzata soprattutto per i processi di separazione, purificazione e decontaminazione.

Nel caso dell'acqua per la sua demineralizzazione.

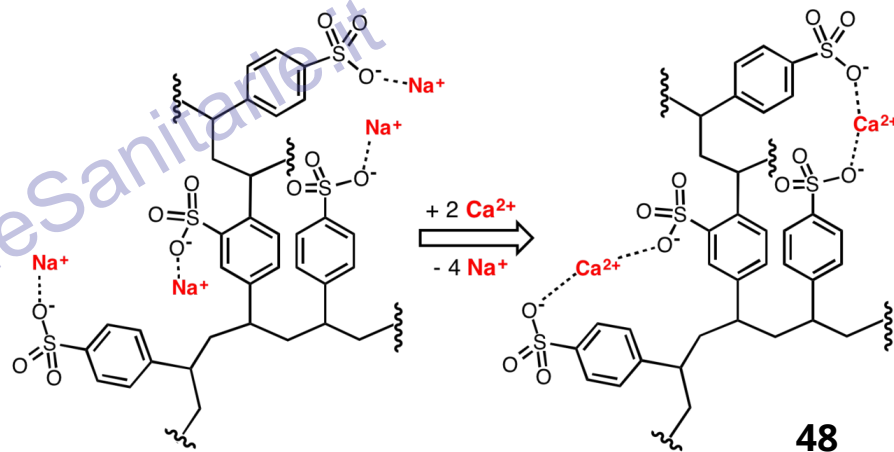


Immagine idealizzata del processo di addolcimento dell'acqua, che comporta la sostituzione di ioni calcio in acqua con ioni sodio donati da una **resina scambiatrice di cationi**

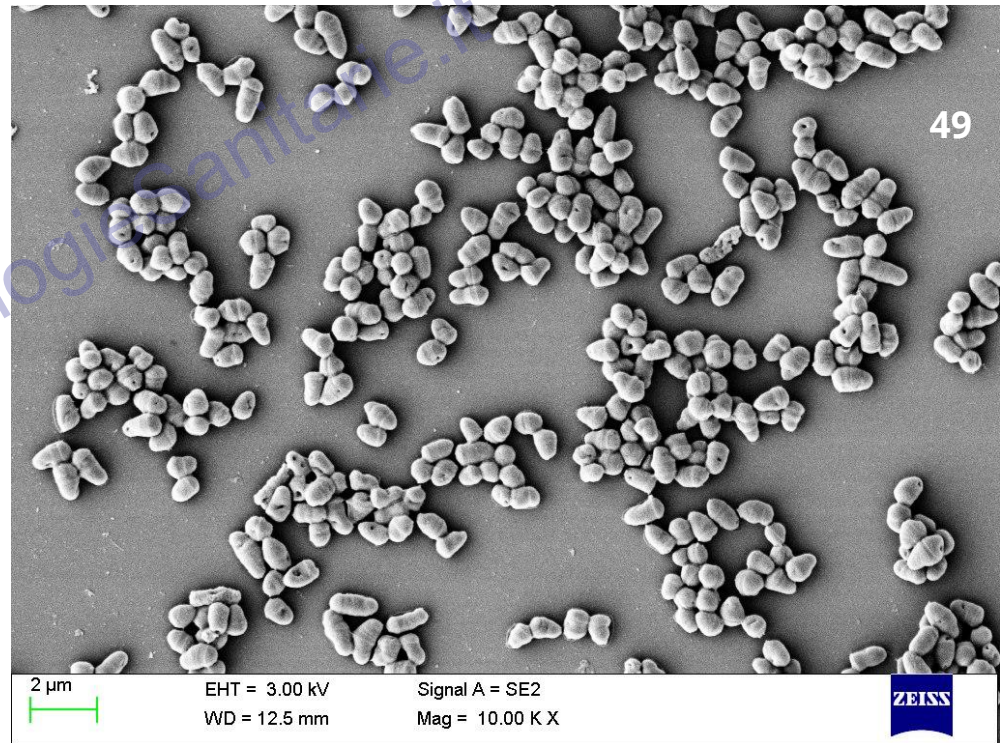
# Amminoacidi: acido glutammico

Riprendiamo l'argomento della produzione degli amminoacidi con l'**acido glutammico**, il più richiesto da sempre sul mercato in quanto utilizzato in grande quantità come esaltatore di sapidità sotto forma di sale sodico (glutammato monosodico - E627) . Furono i giapponesi a scoprire che il batterio **Corynebacterium glutamicum** era un potenziale protagonista della sua produzione industriale. Prima di tutto perché ne sintetizza grosse quantità e soprattutto perché lo si può liberare all'esterno delle sue cellule.



# Amminoacidi: acido glutammico

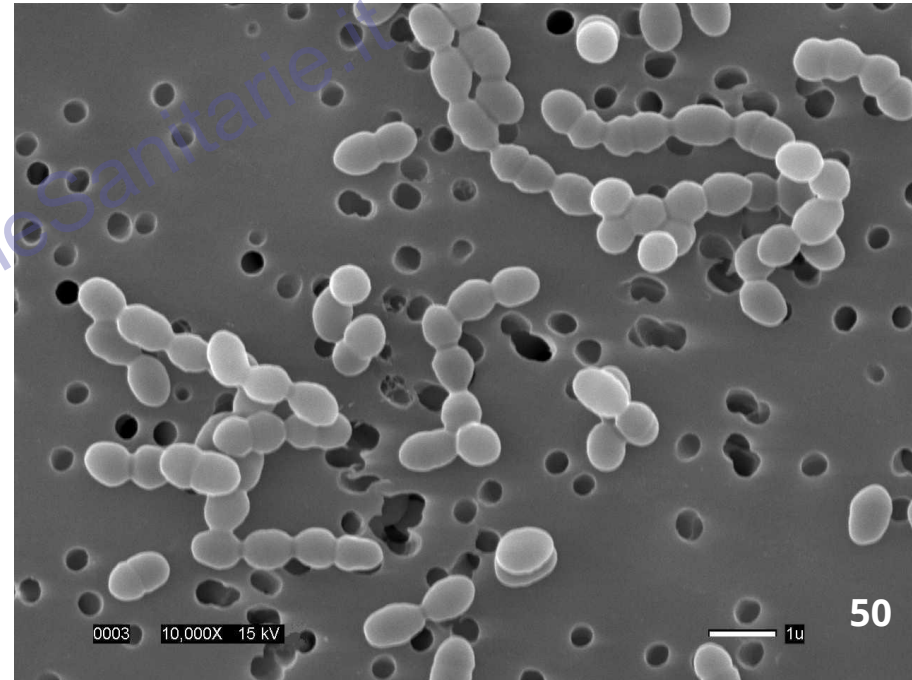
È molto interessante l'iter che ha portato i ricercatori giapponesi a individuare il *Corynebacterium glutamicum* (nella foto al microscopio a scansione) tra tanti ceppi batterici. Tra l'altro, come abbiamo già visto, non produce solo questo aminoacido.





# Amminoacidi: acido glutammico

Gli scienziati sono partiti da *Leuconostoc mesenteroides*, un lattobacillo asporigeno, Gram-positivo e immobile, anaerobio facoltativo, molto diffuso nell'ambiente, implicato in molti tipi di fermentazioni. È stato il loro *indicatore* perché necessita di acido glutammico per crescere.



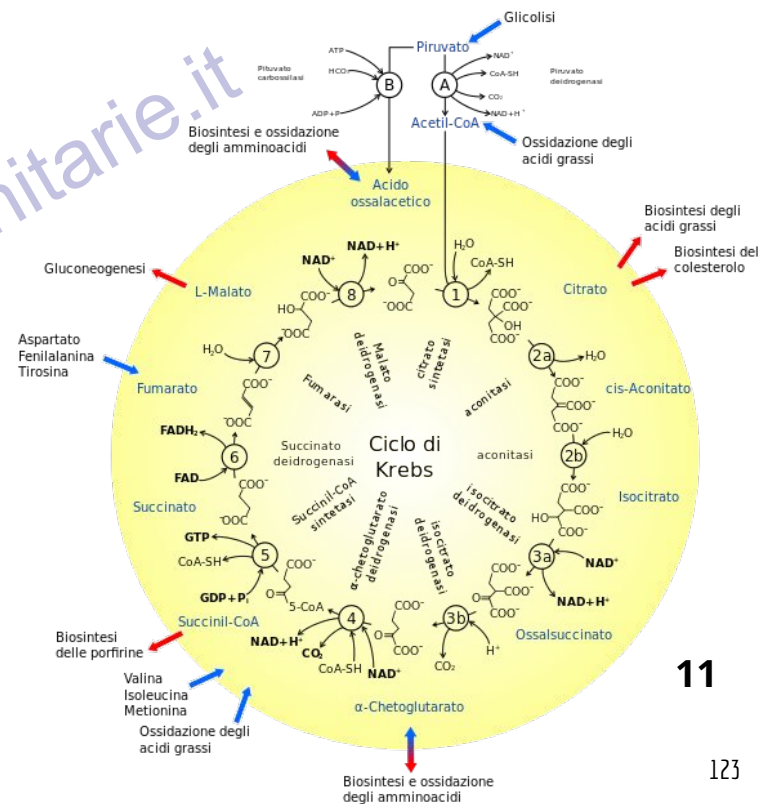
# Amminoacidi: acido glutammico

L'obiettivo era testare numerosi campioni prelevati da ambienti diversi. I campioni venivano seminati in piastre con terreni privi di acido glutammico in modo da far sviluppare una singola colonia da ogni campione. Le colonie sviluppate erano trattate con raggi ultravioletti e poi ricoperte di agar liquido in cui erano presenti i *Leuconostoc*. Le piastre venivano incubate di nuovo.

Se un qualsiasi campione aveva prodotto acido glutammico a questo punto era facile scoprirlo. Infatti l'amminoacido poteva facilmente diffondere nell'agar ed essere utilizzato da *Leuconostoc* per la sua crescita. Intuitivi i dettagli del test.

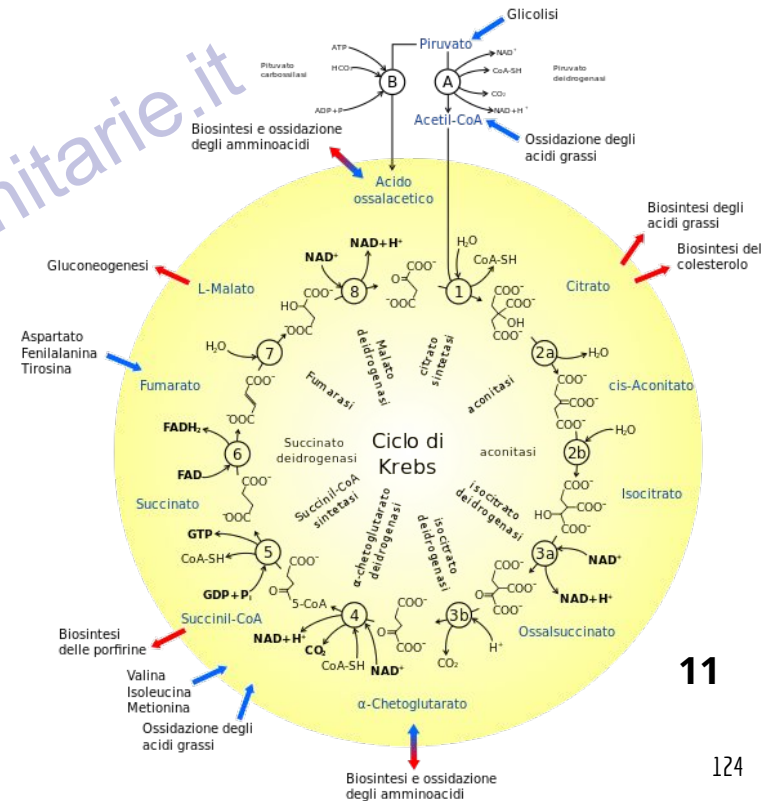
# Amminoacidi: acido glutammico

Vediamo ora la via metabolica utilizzata dal *C. glutamicum* per la biosintesi dell'acido glutammico. Lo schema del ciclo di Krebs ci suggerisce subito che la sua produzione coinvolgerà un intermedio che in questo caso è l' **$\alpha$ -chetoglutarato** che attraverso l'enzima **L-glutamato deidrogenasi (GDH)** si trasforma in **L-glutamato**.



# Amminoacidi: acido glutammico

Lo studio della sintesi dell'acido citrico ci porta subito a dedurre che sarà necessario inibire il passaggio successivo, cioè la trasformazione dell' $\alpha$ -chetoglutarato in succinato grazie all'enzima  $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi (KDH). Inibendo questa fase e favorendo la precedente, l'amminoacido viene accumulato nella cellula batterica.



# Amminoacidi: acido glutammico

Bisogna tenere conto anche del possibile effetto feedback della elevata concentrazione cellulare del glutammato che si può arginare aumentando la permeabilità della membrana cellulare. In questo modo si risolve anche il problema della produzione in ambiente endocellulare perché il prodotto viene secreto all'esterno.

Altro elemento da seguire con attenzione è l'esatta concentrazione di biotina a cui i ceppi batterici sono molto sensibili. Infatti la biotina è un cofattore dell'enzima acetil-CoA carbossilasi. Già che ci siamo analizziamo meglio i cofattori.

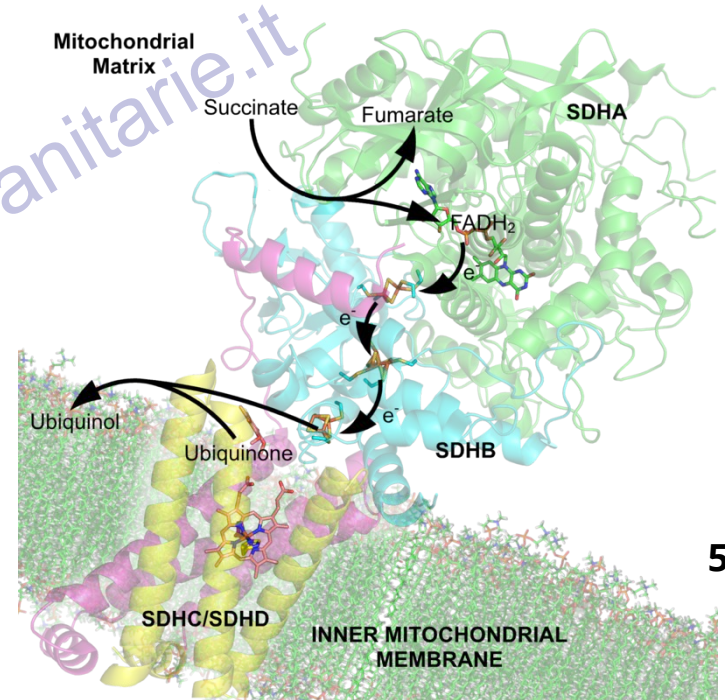
# **APPROFONDIMENTO**

## **Cofattori e coenzimi**

BioTechnologySanitarie.it

# Cofattori e coenzimi

Per svolgere la loro attività gli enzimi hanno spesso bisogno di **cofattori**. Sono o ioni metallici o molecole non proteiche. In altre parole *molecole helper*. L'immagine mostra il complesso della succinato deidrogenasi con numerosi cofattori, tra cui flavina, i centri ferro-zolfo ed eme.



51

# Cofattori e coenzimi

I cofattori si possono a loro volta suddividere quindi in due sottogruppi:

- gli **ioni metallici** ( $Mg^{2+}$ ,  $Cu^+$ ,  $Mn^{2+}$ , cluster ferro-zolfo ...)
- i **coenzimi** formati da molecole non proteiche



# Cofattori e coenzimi

## Ioni metallici

Facciamo qualche esempio di enzima noto che li contiene.

Prima di tutto la lattasi appena esaminata (magnesio e sodio).

Il rame nella citocromo ossidasi.

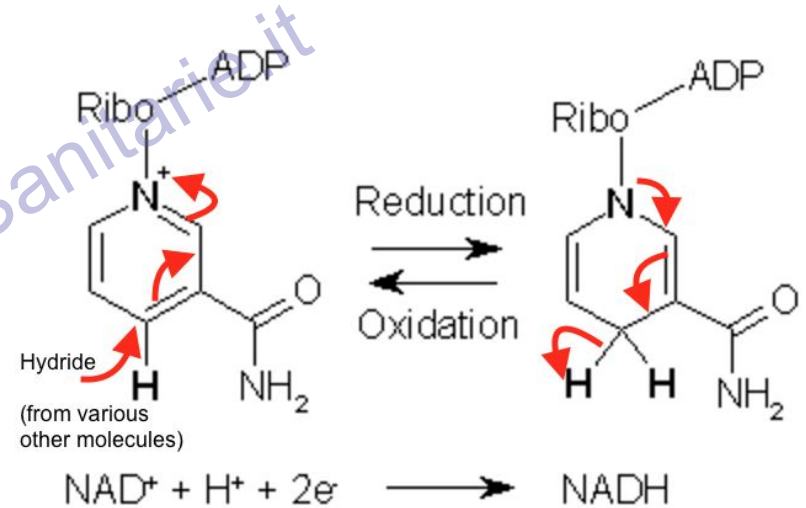
Il ferro nella catalasi.

Il magnesio e lo zinco nella DNA polimerasi.

Lo zinco nella alcol-deidrogenasi.

# Coenzimi e cofattori

**Coenzimi** Sono frazioni non proteiche, che svolgono il ruolo di trasportatori dei gruppi funzionali che l'enzima rimuove dal substrato. Possono essere modificate nel corso della reazione. L'esempio più comune in campo biologico è il **NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adeninucleotide)**, la forma attiva della vitamina PP.

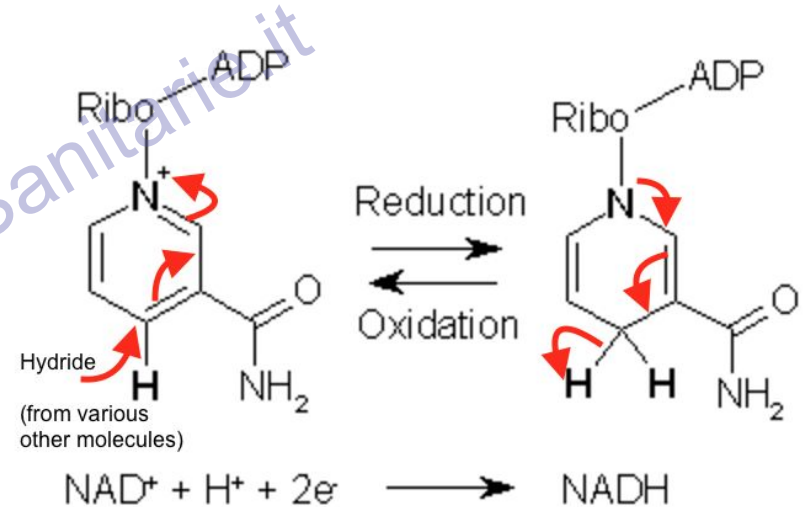


Il gruppo attivo della Nicotinamide sulla molecola NAD<sup>+</sup> subisce ossidazione e riduzione in molte vie metaboliche

# Coenzimi e cofattori

Il NAD<sup>+</sup> è un coenzima associato a molte deidrogenasi.

Come si può vedere nello schema il gruppo attivo della nicotinamide accetta l'idrogeno riducendosi per trasferirlo poi ad un accettore e così rigenerarsi nella forma ossidata NAD<sup>+</sup>



52

Il gruppo attivo della Nicotinamide sulla molecola NAD<sup>+</sup> subisce ossidazione e riduzione in molte vie metaboliche

# Coenzimi e cofattori

Altri esempi di coenzimi.

Per restare nel campo delle vitamine: la **biotina** (biotina -vitamina B<sub>7</sub>) che trasporta CO<sub>2</sub> e il **coenzima A** (acido pantotenico - vitamina B<sub>5</sub>) che trasferisce gruppi acetili.

Non rientrano nelle vitamine invece l'**adenosina trifosfato** che trasporta gruppi fosfato, il **glutatione**, l'**eme** e il **coenzima Q** che si incaricano del trasferimento degli elettroni.

# Amminoacidi: acido glutammico

Torniamo ora al nostro acido glutammico e alla biotina. Non bisogna superare nel terreno di coltura una concentrazione limite di questo coenzima perché favorirebbe la formazione regolare della membrana cellulare per la presenza adeguata di fosfolipidi inibendo quindi il rilascio dell'acido glutammico all'esterno delle cellule batteriche. La spiegazione sta nel ruolo giocato dalla *biotina come coenzima dell'acetil-CoA carbossilasi* che interviene sull'acetil-Coa trasformandolo in malonil-CoA, importante nella sintesi di acidi grassi.

# Amminoacidi: acido glutammico

## Upstream

Ceppi produttori: oltre al **C. glutamicum**, ampiamente descritto, sono da ricordare alcune specie di **Brevibacterium** e **Microbacterium**.

Terreni di coltura: **melassi** come fonte di carbonio, addizionati di **ammoniaca o sali di ammonio** come fonte di azoto e di **biotina** come fattore di crescita.

# Amminoacidi: acido glutammico

Upstream

pH: 7 - 8

Temperatura: 30 - 35°C

Processo: fed-batch

BioTechnologieSanitarie.it

# Amminoacidi: acido glutammico

## Downstream

### Estrazione primaria:

- filtrazione attraverso membrane con pori del diametro di 45  $\mu\text{m}$
- centrifugazione (nel supernatante c'è il prodotto desiderato)

### Separazione mediante cromatografia a scambio ionico

### Cristallizzazione

### Essiccazione



# VITAMINE



BioTechnologySanitarie.it

# Vitamine

Una **vitamina** è un composto organico, un nutriente essenziale ma necessario in quantità moderate che l'organismo non è in grado di sintetizzare.

Deve quindi essere assunto con la dieta.



Confezione di integratori a base di vitamina B

# Vitamine

Le vitamine attualmente riconosciute a livello internazionale sono 13.

Vitamina A, vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>, Vitamina C, Vitamina D, Vitamina E, Vitamina K.

A seconda della solubilità si dividono in:

- **idrosolubili** (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ... B<sub>12</sub>, tutto il gruppo delle B e la C)
- **liposolubili** (A, D, E, K)

# Vitamine

Le vitamine vengono classificate non per la loro struttura ma per la loro attività biologica e chimica. Per cui sotto la dizione “vitamina A” ad esempio vengono considerati il retinolo, i retinali e i carotenoidi conosciuti, cioè l’insieme dei composti accomunati dalla stessa attività (**vitameri**).

I vitameri della “vitamina D” sono il colecalfiferolo e l’ergocalciferolo.

I vitameri della “vitamina E” sono i tocoferoli.

# Vitamine

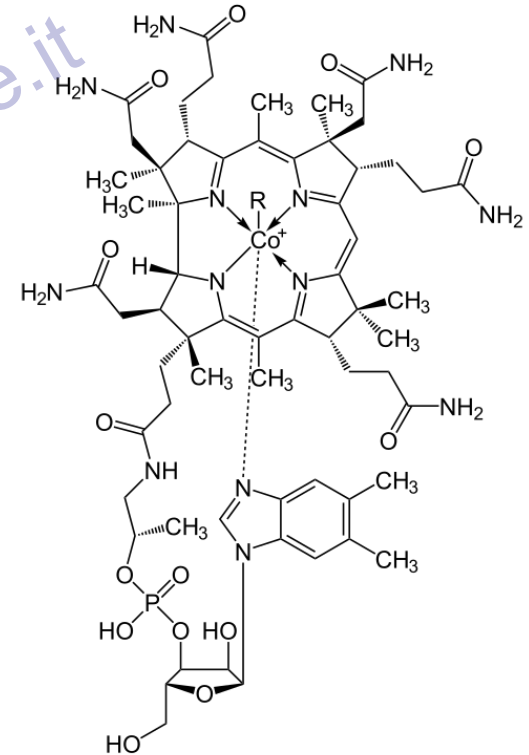
Diverse le funzioni biochimiche svolte dalle vitamine:

- regolazione del **metabolismo minerale** (vitamina D)
- regolazione della **crescita di tessuti e cellule** (alcune del gruppo A)
- **antiossidante** (vitamine C ed E)
- **precursori di coenzimi** enzimatici (gruppo B)

# Vitamine: B<sub>12</sub>

In questa presentazione ci occupiamo della produzione biotecnologica della **vitamina B12** cioè la **cobalamina**.

È essenziale per la maturazione dei globuli rossi nel midollo osseo ed è coinvolta nella sintesi di DNA. Inoltre è importante per il buon funzionamento del sistema nervoso centrale.



# Vitamine: B<sub>12</sub>

## Upstream

Ceppo produttore: **Propionibacterium shermanii** (biosintesi anaerobica) e **Pseudomonas denitrificans** (via aerobica).

Scale-up: lungo, a partire da colture su terreni solidi a cui seguono passaggi su terreni liquidi in volumi sempre maggiori.

Bioreattori: STR ad agitazione meccanica

# Vitamine: B<sub>12</sub>

## Downstream

Ebollizione della brodocoltura e successivo raffreddamento.

Filtrazione.

Estrazione con alcol, precipitazione con miscela acetone/etere.

Estrazione su colonna.

Cristallizzazione.



# Vitamine: B<sub>12</sub>

La vitamina B<sub>12</sub> viene utilizzata in campo alimentare come integratore, in zootecnia nei mangimi per animali e anche, ovviamente nell'industria farmaceutica.

In questo caso è necessario un altissimo grado di purezza e maggiori attenzioni nel processo produttivo. Si parte dalla scelta del batterio che deve sintetizzare solo la vitamina e nessun altro prodotto. Si preferisce la *Pseudomonas denitrificans*.

# Photo credits

- 1 Curva di crescita batterica** - Di L'utente che ha caricato in origine il file è stato MyRedDice di Wikipedia in inglese - Trasferito da en.wikipedia su Commons., GPL, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2047401>
- 2 Acido organico (modello molecolare)** - Di Benjah-bmm27 - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=679954>
- 3 Acido lattico (formula di struttura)** - Di Paginazero - mio disegno, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=48206104>
- 4 Animazione della fermentazione omolattica** — By I Am Not Original6 - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=49050702>
- 5 Produzione casalinga di yogurt** - EBy Anna Frodesiak - Own work, CC0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=39297358>
- 6 Lactobacillus acidophilus** - Von Bob Blaylock - Eigenes Werk, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=12304586>
- 7 Lactobacillus delbueckii (subsp. bulgaricus)** - By Martin A White - Photo taken in Laboratory of glass with bacteria, CC BY-SA 3.0, <https://en.wikipedia.org/w/index.php?curid=42922391>
- 8 Carbone attivo, in polvere e in blocco** - Di Self (en>User:Ravedave) - Self (en>User:Ravedave), CC BY 2.5, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1038326>
- 9 La concia delle pelli in botti specifiche** - By Tomas07 [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>) or GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>)], from Wikimedia Commons
- 10 Acido citrico (formula di struttura)** - Di Utente:Paginazero - mio disegno, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=48206038>

# Photo credits

- 11** [Ciclo di Krebs](#) - Di L'utente che ha caricato in origine il file è stato .jhc. di Wikipedia in italiano - Trasferito da it.wikipedia su Commons da Calipper utilizzando CommonsHelper., CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=10024220>
- 12** [Enzima citrato-sintasi](#) - Di PDB.org (see this site) - <http://www.pdb.org>, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1371359>
- 13** [Aconitasi](#) - Di PDB.org (see this site) - <http://www.pdb.org>, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1371302>
- 14** [Dettagliodell'aconitasi](#) — Di Minutemen, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1213784>
- 15** [Piruvato-carbossilasi](#) - Di Sswilson7 - Opera propria, CC BY 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=10326742>
- 16** [Etanolo \(formula di struttura\)](#) - By Jü - Own work, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=62221756>
- 17** [Bottiglia di alcol etilico](#) - Di Sistoiv - Opera propria, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=51565648>
- 18** [Boccale di birra Export](#) -Di Hans Wastlhuber User:Cointel - Opera propria, CC BY-SA 2.5, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1869855>
- 19** [Esposizione di profumi](#) - Di I, BrokenSphere, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3585104>
- 20** [Distributore di bioetanolo](#) - By Mariordo Mario Roberto Duran Ortiz - Own work, CC BY 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3988176>
- 21** [Ford Taurus a New York](#) - By The original uploader was Uris at English Wikipedia - Uris took this photograph on July 11, 2005. It has a "copyleft" en:BSD license (Less restrictive than GFDL.), CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1785733>

# Photo credits

- 22** [Biostufa](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=29753687) - Di RatStamper - I took a photo of my own bio-ethanol fireplace., CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=29753687>
- 23** [Schema della fermentazione alcolica](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2746868) - Di Giac83 - Opera propria, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2746868>
- 24** [Bioreattore a letto fluido](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=30219112) - Par Borvan53 – Fluidized Bed Reactor Graphic.svg by GYassineMrabetTalk ☒, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=30219112>
- 25** [Impianto di bioetanolo in Germania](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/de/deed.en) — By High Contrast [CC BY 3.0 de (https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/de/deed.en)], from Wikimedia Commons
- 26** [Lavastoviglie](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2196348) - CCO Creative Commons (da pixabay.com)
- 27** [Bicchiere con succo di frutta senza polpa](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2196348) - By Agency of the United States Department of Agriculture - USDA, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2196348>
- 28** [Boccali di birra](https://www.publicdomainpictures.net/en/view-image.php?image=167453&picture=beer) - <https://www.publicdomainpictures.net/en/view-image.php?image=167453&picture=beer>
- 29** [Maltosio \(formula di struttura\)](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2027319) -Di Zippanova - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2027319>
- 30** [Alfa amilasi dell'orzo](http://www.rcsb.org/structure/1AMY) - <http://www.rcsb.org/structure/1AMY>
- 31** [Beta-amilasi dell'orzo](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18729352) - By A2-33 - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18729352>
- 32** [Caseificio](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2196348) - CCO Creative Commons (da pixabay.com)

# Photo credits

- 33** [Chimosina](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=14924005) - Di L. Wall using Jmol - Jmol, Jmol Development Team, GPL, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=14924005>
- 34** [Enzima lattasi](http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1jyn) - By Deposition authors: Juers, D.H., Matthews, B.W.;visualization author: User:Astrojan - <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1jyn>, CC BY 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=48824486>
- 35** [Disegno di bottiglia di latte senza lattosio](#) - CCO Creative Commons (da pixabay.com)
- 36** [Lente a contatto](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=500182) - CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=500182>
- 37** [Stoffe](#) - CCO Creative Commons , da pixabay.com
- 38** [Stone wash su jeans](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5001077) - By Amanda Isch - சொந்த முயற்சி, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5001077>
- 39** [Denim](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=351354) - CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=351354>
- 40** [Pelli finite in magazzino](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=17529224) — Di Tomas07 - Opera propria, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=17529224>
- 41** [Asparaginas \(modello tridimensionale\)](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8668655) - Di Ayacop - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8668655>
- 42** [Asparaginas da E.coli \(cristallografia\)](http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/images/entry/3eca600.png) - Di Jawahar Swaminathan and MSD staff at the European Bioinformatics Institute - <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/images/entry/3eca600.png>, displayed on <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/3eca/summary>, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6242712>
- 43** [L-lisina](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=650933) - Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=650933>
- 44** [Biosintesi della lisina](#) - By Calvero. (Selfmade with ChemDraw.) [Public domain], via Wikimedia Commons

# Photo credits

- 45** [Corynebacterium glutamicum](https://www.flickr.com/photos/adonofrio/6269417254) - <https://www.flickr.com/photos/adonofrio/6269417254>
- 46** [Pellet di resine a scambio ionico](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3500663) - Di Bugman di Wikipedia in inglese - Trasferito da en.wikipedia su Commons da GcG., Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3500663>
- 47** [Ion-exchange resin beads](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4902127) - By William D. Fary III - Own work, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4902127>
- 48** [Processo di addolcimento delle acque](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=27324640) - By Smokefoot - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=27324640>
- 49** [Corynebacterium glutamicum al microscopio a scansione](https://en.wikipedia.org/w/index.php?curid=55336160) - By Vader1941 - Scanning electron microscopy was performed in CeNSE, IISc, Bangalore, CC BY-SA 4.0, <https://en.wikipedia.org/w/index.php?curid=55336160>
- 50** [Leuconostoc mesenteroides](https://genome.igi.doe.gov/portal/leume/leume.home.html) - <https://genome.igi.doe.gov/portal/leume/leume.home.html>
- 51** [Succinato deidrogenasi](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9839906) - By Richard Wheeler (Zephyris) - Based on PDB: 1YQ3. Labeled version of en:Image:Succinate Dehydrogenase Electron Carriers Unlabeled.png., CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9839906>
- 52** [NAD+ e NADH](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4184640) - By JacobShalk [CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)], from Wikimedia Commons
- 53** [Confezione di integratori a base di vitamine B](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4184640) - Di Ragesoss - Opera propria, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4184640>
- 54** [Cobalamina \(formula di struttura\)](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1672868) - Di NEUR0tiker - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1672868>