

MICRORGANISMO nella BIOSICUREZZA: si intende la facilità di coltivazione e manipolazione, assenza di qualsiasi caratteri di patogenicità, alta velocità di produzione, elevata capacità produttiva (ceppo alto produttore) e stabilità genetica (bassa frequenza di mutazione). Dobbiamo andare a prendere i m.o nelle matrici ambientali (aria, H₂O, suolo) che si trovano: in condizioni avverse, alimenti fermentati, campioni contaminati e rifiuti agro-industriali. La selezione di un particolare ceppo costituisce la premessa per lo sviluppo a livello industriale di processi microbiologici. Con il termine screening si identifica una procedura di ricerca per l'individuazione di un m.o produttore di una nuova molecola o alto-produttore di una molecola già nota.

BA: *Acetobacter* (aceto, acido gluconico, acido ascorbico); *Azotobacter* (m.o che fissa N, preparazione di colture azotofissatrici e produzione di alginato che sono degli esopolisaccaridi); *Bacillus* (antibiotici, enzimi, insetticidi, derivati nucleotidici, vaccini); *Gluconobacter* (aceto, acido gluconico, ossidazione di sorbitolo a sorbosio e di glicerolo a diidrossiacetone); *Lactobacillus* (HL, settore lattico-caseario come starter, fermenti lattici, vegetali fermentati, foraggi insilati, stagionatura di insaccati); *Actinobacteria* (antibiotici). *Lactobacillus delburekii* sup. *bulgaricus* è usato industrialmente per produrre HL (omofermentante); *Lactococcus* (nisina – è una batteriocina usata come additivo); *Lactococcus* (destrano, diacetile, vegetali fermentati); *Streptococcus* (sette settore lattico-caseario, fermenti lattici, stagionatura di insaccati, diacetile); *Zymomonas* (prod. di EtOH). I lieviti possono essere utilizzati per la produzione di enzimi; *Candida* (biomasse proteiche da carboidrati, alfa-proteine, alcoli, lipasi); *Kluyveromyces* (lattasi, biomasse proteiche o per estrazione); *Saccharomyces* (alcolici, panificazione, etanolo, biomasse proteiche, iveriasi). Le muffe (funghi filamentosi) sono utilizzate sia come starter (nel settore caseario); per la produzione di enzimi idrolitici (amilasi, proteasi, pectinasi, cellulasi);

Lo screening dei m.o è diviso in primario e secondario. Lo screening primario (finalizzato all'isolamento e alla caratterizzazione dei ceppi produttori) consiste nella raccolta di campioni e isolamento delle culture, eventuale saggio preliminare di attività in solido, saggi di valutazione di attività di un liquido (campione di filtrato culturale), saggi di inibizione enzimatica e caratterizzazione del ceppo produttore ed eventuale brevettazione di m.o e processo; è un'analisi microbiologica dove ci interessa la selezione, non la quantificazione (avendo l'idea di cosa si vuole produrre, so l'habitat e il m.o che devo trovare), utilizzeremo dei mezzi specifici per i m.o da isolare; Una volta isolati un numero alto di m.o andiamo verificare mediante dei saggi su mezzo solido quali tra i nostri isolati posseggono la qualità da noi desiderata (a volte si può fare isolamento selettivo e andare a ricercare quel m.o con quella specifica attività, ci sono dei mezzi che grazie ad un enzima ci permettono di evidenziare la colonia con un alone intorno); a questo punto lo screening trova un m.o produttore di una molecola nota o non nota che comprende uno screening primario e uno secondario.

Per esempio, i saggi di attività in solido si possono fare per ceppi capaci di produrre esopolisaccaridi (metaboliti II), per evidenziare definite attività enzimatiche, per selezione di ceppi produttori di HA e antibiotici. Per evidenziare definite attività enzimatiche nella formulazione del terreno sono inclusi substrati specifici (es caseina per proteasi e amido per amilasi). Per la selezione di ceppi produttori di HA si può impiegare una simile procedura incorporando nel terreno carbonato di Ca, in tal caso la produzione di acido verrà evidenziata da una zona di dissoluzione del carbonato attorno alla colonia. Perché non si fa una determinazione quantitativa su un mezzo liquido? Prima è meglio usare dei metodi veloci per vedere se il m.o ha o non ha quell'attività, se ce l'ha vado avanti facendo la quantificazione assoluta vedendo quanta ne producono. Nello screening di ceppi capaci di produrre enzimi idrolitici si ha lo sviluppo dove si distribuiscono sulle piastre (immagine a sx) alcuni mL di soluzione di Lugol (reattivo base di iodio) che reagisce con l'amido a dare un'intensa colorazione blu/viola, l'idrolisi dell'amido evidenziato dalla mancata colorazione.

Attività amilasica (sulla dx): l'idrolisi dell'amido è evidenziata con la formazione di un alone attorno alle colonie in seguito a idrolisi enzimatica del polisaccaride; reazione apprezzabile attraverso il Reattivo di Lugol, che legandosi all'amido colora di blu/viola il terreno lasciando incolore la restante parte. Screening

preliminare: presenza o meno del glucosio, due diversi valori di pH (6,46 e 5) e due differenti T di incubazione (25 e 30°C).

