

## LEZIONE INTRODUTTIVA (biodiversità)

Le biotecnologie bianche sono le biotecnologie industriali atte alla produzione di un prodotto commerciale sfruttando mezzi biologici = microrganismi. Questi ultimi sono comparsi sulla terra milioni di anni prima dell'uomo e perciò esistono in un numero infinitamente grande e con caratteristiche tra le più svariate; il loro studio (processi metabolici, condizioni di crescita, struttura ecc...) è per appunto fondamentale nella branca delle biotecnologie bianche al fine di ottimizzare la produzione di sostanze già in commercio ed iniziarne di nuove.

La ricerca, l'isolamento e lo studio di microrganismi si basa su diversi principi:

**CLASSIFICAZIONE SULLA BASE DELL'HABITAT** → per cui è possibile "catalogarli" in base alle condizioni ottimali di crescita (questo risulta utile sia per affinare le tecniche di estrazione che per migliorare i tipi di prodotti – sfruttando capacità di organismi di crescere su specifici substrati ed in determinate condizioni) in base alle condizioni di:

- **Temperatura** = mesofili (20-25 °C), ipertermofili (80-90 °C) e psicofili (0-10 °C)
- **pH** = basofili (10-14), neutrofilo (7) e acidofili (1-5)
- **Concentrazioni saline** = alofili moderati ed estremi
- **Pressione** = barotolleranti (1 atm) e barofili (alte pressioni)

**CARATTERIZZAZIONE A LIVELLO FILOGENETICO** → applicazione di metodi molecolari basati sull'amplificazione per PCR e sull'analisi della sequenza genica codificante per RNA ribosomiali:

- **Archea e batteri** = viene analizzata la sequenza interna dell'rRNA 16S in quanto altamente variabile; si sfrutta il fatto che le estremità del gene siano evolutivamente conservate per costruire primers universali (si appaiano sia in archea che in batteri) ed amplificare il gene per tale rRNA (successivamente, per analisi della sequenza sarà possibile caratterizzare le specie presenti nel campione)
- **Funghi** = vengono analizzate le sequenze ITS (internal transcribed spacer) che si trovano tra i geni per l'rRNA 18S e 28S; in particolare queste ultime, essendo altamente conservate, vengono utilizzate come target dei primers

La **PCR** (polymerase chain reaction) è la reazione di amplificazione di sequenze di DNA che si trovano tra due sequenze note, le quali saranno prese come target di primers sintetizzati in laboratorio (sequenze corte di oligonucleotidi a singolo filamento, complementari alle sequenze note sul gene target). Il processo avviene a diverse temperature all'interno di un termociclatore ed è diviso in 3 fasi:

1. **Melting** (94 °C) = denaturazione del DNA (si separano i due filamenti) ed arresto delle reazioni enzimatiche
2. **Annhealing** (50-60 °C) = la temperatura dipende dai primers utilizzati; in questa fase i due primers (forward e reverse) formano continuamente legami ionici con i filamenti di DNA stampo da amplificare, ma solo quelli che si spaiano esattamente formano legami stabili in grado di consentire l'accesso alla polimerasi
3. **Elongation** (70-75 °C) = la temperatura dipende dalla polimerasi utilizzata (la TAQ, quella più utilizzata, lavora a 72 °C); questa fa procedere l'allungamento dei primers correttamente appaiati, generando al termine del processo filamenti copia della sequenza contenuta tra le sequenze target dei primers forward e reverse

Altre tecniche (oltre l'analisi dell'rRNA 16S e delle ITS) che sfruttano la PCR per individuare variabilità di specie in un campione sono:

- **RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)** = tecnica di amplificazione casuale che sfrutta l'utilizzo di un singolo primer casuale, il quale agisce sia come forward che come reverse. La specificità di questa tecnica risiede nel fatto che esista una determinata quantità di "loci RAPD" con sequenze di varia lunghezza, specifiche per ogni microrganismo, pertanto l'analisi per elettroforesi dei frammenti amplificati consentirà di associare un profilo di bande ad un determinato microrganismo.

Una modifica di questa tecnica consiste nella AP-PCR per la quale vengono effettuati dei primi cicli a temperature meno stringenti rispetto a quella ottimale di appaiamento dei primers e successivi cicli a temperature stringenti, in modo tale da riuscire ad amplificare anche loci RAPD che abbiano subito variazioni nella sequenza

- **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)** = prevede la digestione dei frammenti amplificati con specifici enzimi di restrizione marcati, in modo tale da vedere, per analisi elettroforetica (sotto-immersione o capillare) solo determinati frammenti e riconoscere microrganismi per DNA finger-printing (profilo di taglio specifico per il microrganismo)
- **DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)** = (approccio coltura-indipendente) tecnica per la quale vengono separati frammenti di uguale lunghezza mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide in gradiente denaturante; essendo di uguale lunghezza ma di sequenze differenti, i frammenti relativi al DNA di microrganismi differenti verranno separati a seconda della diversa temperatura di melting (che si riflette in una diversa velocità di migrazione in quanto ci si trova in un gradiente denaturante)

Altre tecniche ancora, che però si basano non su PCR, ma su metodi di identificazione enzimatici sono:

- **Conta per fluorescenza** = vengono utilizzati coloranti fluorescenti che consentono di contare i microrganismi presenti in un campione: DAPI (intercalante marcato che colora sia le cellule vive che morte), ioduro di propidio e sytro13 (il primo colora le cellule morte in rosso ed il secondo quelle vive in verde)
- **FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)** = serve per l'identificazione in situ di batteri mediante l'utilizzo di sonde marcate con target l'rRNA 16S, ma non più le sequenze alle estremità, quanto le sequenze interne, ovvero quelle che distinguono le differenti specie; quindi vengono costruite delle sonde marcate con sequenze specifiche per determinati batteri/archea (è possibile anche utilizzarne più contemporaneamente, basta che siano associate a fluorocromi differenti) che consentono di identificarne la presenza all'interno di un campione.

**APPROCCI PER L'ANALISI DELLA BIODIVERSITA' DI UN CAMPIONE** → si distingue tra approcci:

1. **Coltura-dipendente** = prevedono una fase di "arricchimento" dei campioni naturali (prelevare, diluire e piastrare creando condizioni che siano favorevoli per la crescita di uno specifico microrganismo e sfavorevoli per tutti gli altri)
2. **Coltura-indipendente (METAGENOMICA)** = utilizzo di tecniche genomiche moderne per lo studio di comunità microbiche direttamente nel loro ambiente naturale, evitando così il problema del prelevamento e coltivazione in laboratorio (per lo più vengono sequenziati genomi di microrganismi che vivono in habitat difficilmente riproducibili in laboratorio); come tecnica di amplificazione, invece che la PCR, viene utilizzata la **RCA** (rolling circle amplification, amplificazione rollante a cerchio) la quale prevede l'utilizzo della polimerasi Phi29 in grado di promuovere amplificazione contemporanea di più frammenti a partire da primers multipli appaiati su una molecola circolare di DNA mediante più forcelle di replicazione.

Quindi quello che si va ad effettuare non è prelievo e coltivazione di uno o più microrganismi, ma un diretto sequenziamento della popolazione totale di un campione (utilizzando tecniche specifiche per raccogliere DNA ed eliminare sostanze contaminanti quali ad esempio acido umico, che impedisce amplificazione) con cui poi si vanno a costruire le librerie metagenomiche (o metagenoteche); queste possono essere classificate a seconda delle dimensioni degli inserti (dipende dalla tecnica di estrazione = meccanica consente di recuperare maggiore diversità genomica, chimica consente di recuperare DNA a peso molecolare più elevato) in:

- **Piccole** → composte da inserti piccoli (meno di 15kb), vantaggi (nelle librerie i piccoli plasmidi possono essere iper espressi e dunque è possibile rilevare geni che di solito vengono espressi debolmente, possibilità di fare espressione eterologa con vettori, tecnica semplice, costruire librerie anche con DNA contaminato o degradato) e svantaggi (necessario un gran numero di cloni, non è utile nel caso di cluster genici molto grandi o separati fra loro)
- **Grandi** → composte da inserti grandi (più di 15kb) che utilizzano cosmidi o BAC (bacterial artificial chromosome, sequenze cromosomiche stabili che consentono di clonare frammenti di grandi dimensioni al loro interno), vantaggi (basta un numero piccolo di cloni, elevata probabilità di avere cluster genici interi) e svantaggi (costruzione delle librerie più complicata in quanto si richiede DNA di più alta qualità e

grandi dimensioni, basso numero di BAC/cosmids può limitare l'isolamento di geni debolmente espressi in quanto mascherati da quelli maggiormente espressi)

Oltre che su DNA genomico, una libreria metagenomica può anche essere basata su **cdNA** (DNA retrotrascritto a partire da RNA), il che consente di ottenere informazioni funzionali riguardo la comunità microbica, ma allo stesso tempo prevede l'applicazione di tecniche molto più complicate (l'RNA è più instabile del DNA).

Pertanto, a seconda dell'informazione ottenuta (sequenza o funzione), le biblioteche metagenomiche possono anche essere classificate in:

- **Librerie di funzione (function driven)** = costruite in BAC o cosmids, permettono l'identificazione di cloni che esprimano una caratteristica desiderata, possibilmente con fenotipi che consentano una selezione positiva (es. resistenze ad antibiotici, crescita su particolari fonti di C ecc...).

Siccome nella maggior parte delle librerie metagenomiche viene utilizzato Coli come sistema vettore-ospite, il quale in alcuni casi non è in grado di esprimere determinati geni, le percentuali di cloni positivi selezionati variano a seconda dell'enzima (per superare questo problema possono essere sfruttati ospiti alternativi, quali ad esempio: streptomyces lividans per metaboliti secondari, utilizzato in quanto appartiene allo stesso taxa di comunità presenti nel suolo quindi riconosce più facilmente DNA "estraneo").

- **Librerie di sequenza (sequence driven)** = costruite in plasmidi (di più piccole dimensioni), permettono l'identificazione di nuovi enzimi che però appartengano a famiglie già note (ricerca per identità di sequenza; cerco un enzima che possa svolgere la funzione di un altro enzima di sequenza nota, ma con maggiore efficienza od in condizioni diverse). In queste librerie il vantaggio è che il gene non deve essere espresso (pertanto è utilizzabile tranquillamente Coli) e che non si devono effettuare screening fenotipici.

La problematica principale con cui si ha a che fare quando si sfruttano approcci di metagenomica, consiste nel fatto che alcuni cloni con struttura/funzione desiderata, possano essere rappresentati all'interno della libreria con una bassa frequenza. In tali casi è possibile **applicare strategie di arricchimento**, mettendo in risalto le popolazioni con il gene di interesse (quindi essere più rappresentate nelle librerie); tecniche:

- **Arricchimento da bromodeossiuridina (BrdU)** = analogo strutturale che si incorpora come l'uracile nelle cellule in attiva divisione; se aggiunto al campione di suolo prima di estrarre il DNA, permetterà di evidenziare per appunto le cellule in attiva divisione e, sfruttando specifici anticorpi, "catturarne" il DNA (selettività per microrganismi metabolicamente attivi ed in divisione in un determinato ambiente)
- **Stable isotope probing (SIP)** = si utilizza un substrato marcato con uno specifico isotopo, per cui sarà possibile individuare i microrganismi in grado di metabolizzare tale substrato
- **Arricchimento diretto sulle genoteche** = si analizza quali sono i cloni di una libreria già formata in grado di crescere su uno specifico substrato
- **Metodo SIGEX (Substrate Induced Gene Expression Screening)** = tecnica atta alla ricerca di specifici cloni in una libreria metagenomica in grado di indurre l'espressione di determinati geni coinvolti nel catabolismo di un substrato in presenza del substrato stesso (non voglio trovare quelli che effettuano un "catabolismo costitutivo" ma piuttosto uno "inducibile", svolto per mezzo di geni espressi esclusivamente in presenza del substrato). Fasi del processo: si clona la libreria in un vettore plasmidico associato a GFP, si fanno crescere i cloni, si effettua citofluorimetria per identificare i cloni che esprimono in modo costitutivo la GFP (e quindi i geni coinvolti nel catabolismo del substrato), si eliminano questi e si prendono solo i cloni che non hanno espresso GFP ed infine si fanno crescere questi ultimi sul substrato desiderato andando a selezionare quelli che esprimono GFP (e dunque i geni del catabolismo).

## ARCHEA

Sono un phylum di procarioti estremamente utili nelle applicazioni biotecnologiche, evolutivamente considerabili come una via di mezzo tra batteri ed eucarioti: non hanno peptidoglicano nella parete (alcuni non hanno parete), hanno una RNA polimerasi unica ma molto simile a quella eucariotica (13 subunità a fronte delle 5 di quelle batteriche), presentano bilayer lipidico costituito da terpeni piuttosto che acidi grassi (nicchie di microrganismi abbastanza stabili che non andando incontro a variazioni ambientali non necessitano di adattamenti di membrana, permessi dai fosfolipidi mediante saturazione/insaturazione degli acidi grassi), presentano cromosoma singolo ma compattato per mezzo di istoni (invece di formare ottameri come negli eucarioti, formano tetrameri), hanno più punti di origine di replicazione, macchinario replicativo simile a quello eucariotico, presentano raramente introni (solo nei geni per tRNA ed rRNA) e la trascrizione avviene ad operoni (come nei batteri).

Si dividono in:

### CRENARCHEOTA

Abbiamo visto gli ipertermofili; *pyrodictus occultum* (isolato da vulcani sottomarini, ceppo 121 particolare = cresce a 121 °C, resiste fino a 130, presenta flagelli e produce magnetite, per cui le cellule possono essere calamitate)

### EURYARCHEOTA

Oltre 50 generi con fisiologia molto eterogenea, sono principalmente:

#### 1. ALOFILI (halococcus e halobacterium)

Microrganismi che crescono in habitat caratterizzati da elevate concentrazioni saline (in base alle quali si possono distinguere alofili estremi, moderati ed alotolleranti) ed una bassa attività dell'acqua (0,75 considerando che la minima necessaria per la "vita", associata alla sopravvivenza di spore, è uguale a 0,6), sono per lo più aerobi, possono assumere le forme più disparate e utilizzano come fonte di carbonio aminoacidi ed altri acidi organici.

**Produzione di energia (sotto forma di ATP)** = sfruttano la luce solare (non per fotosintesi) mediante il sistema: bacteriodopsina (proteina transmembrana simile al pigmento visivo della rodopsina, in grado di assorbire luce nel visibile) + retinale (pigmento associato alla bacteriodopsina, in grado di sfruttare l'energia luminosa per creare un gradiente protonico lungo la membrana, poi utilizzato dalla ATP sintasi per produrre ATP).

**Genoma** = costituito da un grande cromosoma principale e vari piccoli cromosomi aggiuntivi (non possono essere considerati plasmidi in quanto contengono geni essenziali per la crescita; sono inoltre in continua evoluzione in quanto subiscono effetti di trasferimento genico orizzontale – sono stati trovati elementi di inserzione).

**Meccanismi di adattamento** = come fanno a sopravvivere in queste condizioni apparentemente incompatibili con la vita? Hanno sviluppato diversi meccanismi di adattamento, quali:

- Accumulo di soluti all'interno della cellula per contrastare la pressione osmotica esterna (possono essere ioni come nel caso dell'*halobacterium* che mantiene il potassio a concentrazioni maggiori rispetto al sodio nel mezzo esterno, oppure composti organici/osmoliti che prendono il nome di **estremoliti** e che possono essere non carichi o zwitterionici)
- Proteine citoplasmatiche polari in quanto povere in aminoacidi idrofobici (ciò consente di rimanere nella conformazione attiva nonostante le alte concentrazioni di ioni quali potassio; se fossero poco polari tenderebbero ad aggregarsi)
- Ribosomi adattati alle alte concentrazioni di potassio (funzionano solo in tali condizioni)
- Membrana ricca in glicoproteine molto acide (cariche negativamente ma schermate dal sodio presente nell'ambiente esterno; senza sodio, quindi senza sale, le cariche negative si respingono e provocano lisi)

La presenza di **estremoliti** all'interno della cellula (in elevate concentrazioni, pertanto devono essere compatibili con la vita) è molto importante non solo per bilanciare la pressione osmotica, ma anche per numerose altre funzioni di protezione quali: stabilizzazione della struttura terziaria di proteine (gli osmoliti non formano direttamente interazioni con le proteine, ma con il solvente – acqua - provocando una modificazione dell'interazione di quest'ultimo con la proteina stessa = stabilizzazione), aumento della soglia di inattivazione termica delle proteine (proteggono dalla denaturazione provocata da alte temperature), effetto crioprotettivo su anticorpi (che mantengono più del 90% fino

a 4 cicli di congelamento e scongelamento), proprietà antiossidanti, protezione del DNA dal danno dei radicali liberi e delle radiazioni UV. Esempi di estremoliti: ectoina, firoina, idrossiectoina.

#### **Applicazioni industriali relative agli alofili:**

- Estremoliti = nella produzione di proteine ricombinanti (la produzione massiva in Coli causa aggregazione di proteine denaturate nei corpi di inclusione, aspetto utile per la purificazione, ma è prima necessario rinaturarle per cui si usa **ectoina** per il refolding), come protettori cellulari (da stress di disidratazione e dalla citotossicità, es. ectoina riduce la lisi degli eritrociti in presenza di surfactanti ed agenti denaturanti), come aumento della stabilità dei vettori adenovirali (che normalmente perdono efficienza durante trasporto e conservazione), stabilizzazione contro congelamento e scongelamento (**fibroina A**). Tutti quelli nominati fin ora sono osmoliti a basso peso molecolare, ma se ne è scoperto uno di grandi dimensioni che in condizioni normali agisce all'esterno dell'organismo da cui è prodotto: **poligluttammato (PGA)** da archea aegyptiaca (ha funzioni crioprotettive, aumento di stabilità contro proteolisi e pH alcalini, protezione da varie situazioni di stress)
- Alofili come ospiti per produzione di molecole ricombinanti = esempio del levano (polimero del fruttosio con legami 2,6 beta, probiotico umettante in grado di attivare la proliferazione cellulare, risposte infiammatorie, attivatore della sintesi di procollagene e mantenere i cheratinociti idratati): prodotto tramite halomonas a partire da saccarosio, se ne è perfezionata la resa studiando gli effetti di composizione del terreno (in termini di concentrazione di sale e substrato), trattamento con acido borico/suoi derivati industriali (diminuisce la biomassa ma aumenta la resa specifica), controllo/non controllo di pH (un non controllo influisce positivamente sulla resa specifica e cala di pochissimo la biomassa) e tipo di processo (batch/discontinuo vs fed-batch/continuo; il batch presenta una minore biomassa ma aumento della resa).  
Il principale vantaggio che deriva dall'utilizzo di alofili nelle produzioni industriali consiste proprio nel fatto che questi richiedano concentrazioni saline abbastanza elevate per crescere, il che permette di eliminare la fase di sterilizzazione (il sale agisce come anti-microbico)

## **2. METANOGENI (methanobacterium, methanocaldococcus, methanosarcina)**

Microrganismi produttori di metano, sono anaerobi obbligati (al posto dell'ossigeno questi organismi usano come accettore finale di elettroni il carbonio molto ossidato di alcuni composti), spesso ipertermofili e possono assumere diverse forme (riflette la diversità di habitat che sono in grado di colonizzare). Si distingue tra:

- **Chemoautotrofi** = in grado di produrre metano a partire da CO<sub>2</sub> ed H<sub>2</sub> presenti nell'atmosfera (questi producono 1/3 del metano totale da metanogeni)
- **Chemoeterotrofi** = in grado di produrre metano a partire da diversi composti organici, ma mai da zucchero; quello che succede è che i metanogeni vivono in comunità (sintrofie) con altri batteri, i quali sintetizzano il substrato necessario al metanogeno (principalmente acetato) a partire da zuccheri più o meno complessi (fermentatori primari) oppure da acidi grassi (fermentatori secondari)

Le **vie metaboliche** possono essere: acetoclastica (a partire da acetato), idrogenotrofica (a partire da CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>) e metilotrofica (rari casi, a partire direttamente da metanolo); i **coenzimi** interessati sono molti e possono essere divisi in due categorie: coinvolti nel trasporto del carbonio da CO<sub>2</sub> a metano e quelli coinvolti nelle reazioni di ossidoriduzione.

Esempi:

- Methanocaldococcus jannaschii → a singole cellule, vive vicino ai venti idrotermali (temperature e pressioni molto elevate), è stato il primo metanogeno estremofilo ad essere stato sequenziato = ha un grande cromosoma principale circolare e due cromosomi accessori (uno più grande ed uno più piccolo) in cui porta per lo più geni specie-specifici (non condivisi con altri organismi), alcuni con similarità rispetto ai batteri (per lo più geni metabolismo) ed altri rispetto agli eucarioti (sistemi di secrezione)
- Methanosarcima acetivorans → si trova nelle foglie in decomposizione, nei fanghi dei depuratori di trattamento delle acque e nello stomaco dei ruminanti; è il metanogeno tra quelli sequenziati con il genoma

più grande (una buona parte sono legati alla metanogenesi; ha la capacità di esprimere flagelli ma non si sono ancora trovate le condizioni per farli esprimere).

Come detto dunque questi si trovano in gran quantità nei "consorzi microbici" all'interno di **impianti di depurazione** (mediante trattamento anaerobico) **delle acque in presenza di prodotti di scarto quali** i cosiddetti **FOG** (oil and grease), ovvero sostanze di scarto derivanti da olio, grasso e gelatina; molto spesso, infatti, questi impianti sono associati a digestori per la produzione di biometano, il quale viene raccolto ed utilizzato come fonte di energia. Particolarità di questi fanghi "FOG" è quella di avere un elevato rapporto C/N, ottimale per la stimolazione del processo metanogeno, ma dall'altro lato problematico per l'accumulo di acidi grassi a catena lunga (distruggono la membrana cellulare, riducono il trasporto e la permeabilità delle cellule); a questo proposito entrano in gioco determinati batteri che si trovano in sintrofia e sono in grado di effettuare beta ossidazione di tali acidi grassi, consentendo al processo di proseguire (osservando la curva di produzione di metano in funzione del tempo, si nota una iniziale fase di lag, dovuta proprio al riassetto metabolico delle comunità microbiche a causa del caricamento di queste elevate concentrazioni di acidi grassi)

#### Applicazioni industriali:

- Produzione di biometano utilizzando prodotti di scarto derivanti dalla lavorazione della barbabietola da zucchero (melasse) → al termine dei processi lavorativi di estrazione e purificazione del saccarosio dalla barbabietola (indirizzato all'industria alimentare), si ottiene una parte di zucchero cristallizzato ed una costituita dalla melassa vera e propria, ovvero acqua madre di cristallizzazione contenente componenti secondari e saccarosio in concentrazione elevata. Una volta fatto ciò, è possibile utilizzare la melassa come substrato per la produzione di metano per mezzo di consorzi microbici di metanogeni e **clostridium cellulovorans** (microorganismo anaerobio in grado di utilizzare gli zuccheri per sintetizzare substrato necessario ai metanogeni)
- Produzione di biometano utilizzando cellulosa derivante da scarti → si sfrutta sempre la sintrofia con clostridium cellulovorans il quale, come dice il nome stesso, possiede gli enzimi per metabolizzare la cellulosa (complesso del celulosoma, proteine presenti sulla superficie cellulare che al microscopio elettronico risultano come dei bozzi sulla superficie del microorganismo). 2 esperimenti sulla metabolizzazione di cellulosa da parte di c. cellulovorans: il primo per vedere se cresce quando come substrato si utilizza polpa esausta derivante dalla lavorazione di barbabietola piuttosto che cellulosa commerciale (si cresce, con un picco di crescita nelle prime ore rispetto ad un picco dopo circa 5 ore quando cellulosa come substrato), il secondo per mettere a confronto il consorzio presente nei fanghi dal trattamento di depurazione delle acque con e senza c. cellulovorans (si vede che: gli zuccheri vengono utilizzati solo con c.cell., il metabolismo primario è invariato e si ha produzione di metano in entrambi i casi, il che vuol dire che la produzione di metano per consorzi di c.cell. con metanogeni in presenza di zuccheri derivanti da sostanze di scarto è un processo fattibile).

### 3. ACIDOFILI ESTREMI

Vivono in condizioni di pH estremamente bassi (vicini allo 0) e sono per lo più ipertermofili:

- **Picrophilus** (torridus e oshimae) → crescono a pH 0 e temperature di circa 65°C; le caratteristiche relative all'adattabilità a questi ambienti sono riscontrabili nel genoma (alta densità genica, 91% codifica per geni), il quale è altamente condiviso (fino al 66%) tra classi filogeneticamente anche molto distanti (per trasferimento orizzontale) e contiene una gran quantità di geni che codificano per trasportatori secondari = proteine a singola subunità che usano il gradiente protonico per effettuare il trasporto (siccome si viene a generare anche un pH intracellulare acido, è necessario che le proteine presentino un'abbondanza di residui idrofobici sulla propria superficie, al fine di rimanere attive)
- **Thermoplasma** (acidophilum) → cresce a pH < 2 e ad alte temperature, non presenta parete cellulare ma nonostante questo resiste a stress osmotici = la membrana contiene lipoglicano (lipopolisaccaride, lipide legato a polimero saccaridico) e numerose glicoproteine che le conferiscono notevole stabilità strutturale. Ha geni per rRNA dispersi nel genoma (non contigui), proteina Hta per impacchettamento DNA, citoscheletro.

#### **4. IPERTERMOFILI**

Crescono a temperature ottimali superiori a 80°, sono anaerobi obbligati ed utilizzano zolfo come accettore finale per la produzione di acido solfidrico. Esempi: methanopyrus (il più termofilo, cresce a 110°C ed è in grado di produrre metano a partire da idrogeno e CO<sub>2</sub>), archeoglobus (ponte evolutivo verso i metanogeni, produce diversi enzimi della via metanogenica ma non quello chiave, quindi non produce metano)

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

## BIOPLASTICHE

Polimeri biodegradabili (i più conosciuti sono quelli della classe dei poliidrossialcalonati = PHA) utilizzabili come sostituenti delle plastiche derivanti dalla lavorazione del petrolio.

Vengono prodotti durante la "fase stazionaria" da plurime specie batteriche (sia gram - che +), come sostanza di riserva che viene conservata all'interno di granuli batterici (= vescicole delimitate da bilayer lipidico, costituito anche da particolari proteine chiamate fasine che hanno funzione di interfaccia tra l'esterno idrofilico e l'interno idrofobo del polimero; overespressione di fasine risultano nella formazione di numerose piccole vescicole, underespressione nella formazione di un unico grande granulo); le vie metaboliche sono molteplici a seconda dei microrganismi analizzati, ma coinvolgono per lo più reazioni enzimatiche guidate dalla sintetasi faC (scoperta per analisi confronto di resa in ceppi wt vs ceppi mutati/deleti nel gene Fac).

Nonostante rappresentino una valida alternativa dal punto di vista ecologico rispetto alle plastiche tradizionali, le bioplastiche vengono ancora utilizzate troppo poco e solo in specifici settori (come quello ortofrutticolo), principalmente perché i costi di produzione sono molto elevati (si cerca di abbatterli lavorando sulla composizione del terreno e più nello specifico sulla fonte di carbonio utilizzata).

- **Produzione di bioplastiche utilizzando crusca (scarto della lavorazione del grano) come substrato**

1. **Pretrattamento della crusca** → la crusca è una sostanza di scarto che deriva dalla lavorazione del grano ed è ricca in carboidrati complessi quali cellulosa ed amido, ovvero carboidrati complessi che, prima di poter essere utilizzati come substrato dai microrganismi, devono essere idrolizzati. Prima di passare alla fase di idrolisi (scomposizione), però, è preferibile effettuare un pretrattamento alcalino della crusca rendendo in questo modo più facile l'attacco di enzimi idrolitici
2. **Idrolisi enzimatica** → avviene in buffer acido per trattamento con enzimi per lo più fungini (cellulasi e beta glucosidasi), che dunque liberano gli zuccheri fermentabili (ora separabili dagli enzimi per centrifugazione)
3. **Composizione del substrato** → dopo l'idrolisi enzimatica si recupera il supernatante (zuccheri fermentabili) e si aggiunge fonte di azoto, che si trovi in rapporto con quella di carbonio per circa 20:1 (C:N)
4. **Aggiunta dell'inoculo e fermentazione** → si aggiunge un 1% di inoculo (Ralstonia eutropha = batterio gram -) e si fa partire la fermentazione (30 °C per 96h in agitazione)
5. **Recupero del prodotto** → vengono innanzitutto recuperate le cellule e sospese in solventi specifici per provocarne la lisi (ipoclorito di sodio e cloroformio), successivamente si concentrano i detriti cellulari e si provoca la precipitazione del polimero in presenza di metanolo (poi viene recuperato puro per essiccazione)

**Studi** → sull'efficacia del pretrattamento della crusca (aumento della resa rispetto all'utilizzo di crusca non pretrattata) e sulla resa in biomassa (e dunque prodotto, in quanto il polimero è associato alla crescita) rispetto a diverse fonti di azoto (la migliore è il solfato di ammonio)

- **Produzione di bioplastiche utilizzando olio esausto come substrato e alofili come microrganismi**

Questo approccio consente sia di **risparmiare** sulla fonte di carbonio (olio esausto da frittura, di origine da grano o girasole) che sui costi di sterilizzazione (gli alofili infatti, crescendo su alte concentrazioni saline, permettono di evitare la fase di sterilizzazione del bioreattore proprio perché crescono in condizioni estremamente sfavorevoli alla vita).

**Studi** → sull'influenza delle concentrazioni saline (Almonas hydrothermalis risponde linearmente a variazioni di concentrazione mentre Neptunia non lo fa in modo chiaro), sul peso molecolare e la grandezza del polimero prodotto (più grande in Almonas hydrothermalis) e sull'influenza dell'aggiunta di precursori riguardo la produzione di polimeri più complessi (solo in Almonas hydrothermalis l'aggiunta di valerato consente la produzione di 3-idrossivalerato, biopolimero più grande e con catena lunga che ne influenza in positivo le caratteristiche = più simile alla plastica da petrolio).

## BIOSENSORI

Per biosensore si intende un sistema costituito da un'unità **sensibile** basata su materiale biologico (subcellulare o cellule intere, immobilizzate su supporti solidi di varia natura come ad esempio inglobazione in polimeri naturali), coniugata ad un **sistema di misurazione** (in genere elettronico) mediante un "trasduttore" del segnale (es. molecola luminosa); tale sistema consente di saggiare parametri relativi all'effetto che determinate molecole (analiti) possono avere sull'unità sensibile, quali:

- **Biodisponibilità**
- **Tossicità semplice** (esposizione per breve tempo, acuta se alte concentrazioni)
- **Tossicità cronica** (esposizione a lungo termine a basse concentrazioni)
- **Genotossicità** (capacità di indurre modifiche nel DNA)

### UTILIZZO DI BATTERI COME BIOSENSORI

#### 1. TEST DI AMES

Test per saggiare le capacità genotossiche/cancerogene di molecole di neosintesi. Viene utilizzato un ceppo his- di salmonella enterica, incapace di crescere in assenza di istidina → se in seguito all'esposizione all'analita questi ceppi presentano retromutazione (quindi riacquisiscono la funzionalità del gene, cosa che spontaneamente avviene molto raramente) si potrà affermare che l'analita ha effetti genotossici tanto maggiori quanto maggiore è il numero di colonie (altra evidenza è rappresentata dal fatto che queste crescano in vicinanza del dischetto imbevuto di analita)

#### 2. APPROCCIO "LIGHT OFF"

Viene misurata la riduzione di emissione di segnale luminoso relativo ad una proteina bioluminescente del batterio vibrio fischeri (più recentemente si è spostato il sistema in coli) in seguito ad esposizione all'analita → questo interferisce con i processi di trascrizione/traduzione/espressione del segnale luminoso.

#### 3. APPROCCIO "LIGHT ON"

Proteina reporter luminescente associata ad uno o più promotori che in condizioni normali regolano l'espressione di agenti del riparo del DNA (quindi sono sensibili a segnali di stress) → luminescenza (quindi espressione reporter luminescente) indotta dall'attivazione di tali promotori per tossicità dell'analita

#### 4. SISTEMI COMBINATI

Applicazione di due sistemi contemporaneamente (nello stesso microrganismo):

- Promotore **RecA** (parte del sistema SOS, attivato dal danno a DNA) associato a GFP
- Promotore **grpE** (parte del sistema di risposta a stress) associato ad un'altra proteina fluorescente (colore diverso)

Usati in combinazione consentono dunque di saggiare effetti genotossici e tossici di uno stesso analita

#### 5. SENSORI IN ARRAY

Biosensori che sfruttano una collezione di microrganismi (per lo più si usa coli) ibridati con luciferasi sotto il controllo di vari promotori conosciuti; così facendo è possibile analizzare contemporaneamente l'effetto di uno stesso analita su più promotori (quindi funzioni), mettendo in relazione il segnale/profilo della luciferasi nel controllo (in condizioni normali) con quello relativo all'esposizione all'analita (quali sono i promotori che si accendono/spengono?).

**UTILIZZO DI LIEVITI COME BIOSENSORI** → specie più utilizzata è il *saccharomyces cerevisiae*; perché vengono utilizzati spesso? Si trova a buon mercato in forma secca attiva in cui può resistere per lunghi periodi, cresce su substrati a basso costo, essendo eucariota può funzionare come base per studi relativi agli eucarioti superiori (nel caso di meccanismi legati alla trasduzione del segnale), può tollerare varie e brusche variazioni ambientali (pH, pressione osmotica) ma soprattutto se ne conosce perfettamente fisiologia e genoma (pertanto è facilmente trasformabile per ottenere ceppi specifici, già ne esiste un gran numero). Esempi:

#### 1. BIOSENSORI BASATI SU GPCR (recettori accoppiati a proteine G)

Le proteine G sono proteine trimeriche associate ad un recettore di membrana (proteina transmembrana) il quale è costituito da un dominio N-terminale (rivolto verso l'esterno) in grado di interagire con molecole di varia natura ed

uno C-terminale (rivolto verso l'interno) in grado di fosforilare la subunità alfa della proteina G, provocando una serie di eventi a catena = modificazione conformazionale della subunità beta, attivazione della cascata chinasi (passa per MAP chinasi) e, per ultimo, fosforilazione di un fattore di trascrizione, il quale migrando all'interno del nucleo guida l'attivazione dell'espressione di specifici geni; in particolare il lievito ha due proteine G associate al sensing del feromone e del glucosio.

- **Test di gravidanza** → vengono utilizzate cellule di lievito ingegnerizzate al fine di rilevare e rendere visibile la concentrazione di gonadotropina umana presente nel campione; in particolare viene: inattivato il recettore endogeno di lievito accoppiato a proteine G, trasferito nel lievito in modo costitutivo il gene per il recettore (transmembrana) della gonadotropina umana (si associa autonomamente a proteine G endogene), aumentata la permeabilità della parete cellulare (che in condizioni normali non consente alla gonadotropina umana di attraversarla in quanto proteina troppo grande) effettuando delezione del gene codificante per una mannoproteina costitutiva della parete ed infine utilizzate le proteine G per la cascata di segnale che porta all'attivazione di triptofanasi la quale, insieme a monossigenasi (espressa costitutivamente), comporta la formazione di indaco (colore blu) a partire da triptofano.

## 2. RILEVAMENTO DI COMPOSTI CHIMICI (contaminanti ambientali) CHE INIBISCONO L'ATTIVITA' DI AchE

Impiego di *Kluyveromyces lactis* in cui l'unità sensibile è rappresentata dall'enzima acetilcolinesterasi (prima veniva utilizzata come enzima immobilizzato, ma si è visto che l'approccio di analisi di tale enzima all'interno del microorganismo risulta essere più stabile), il quale catalizza la reazione di idrolisi dell'acetilcolina.

Si sono **ingegnerizzati** due diversi ceppi di lievito *K.lactis* (uno wt ed uno Klpmr1delta delecto per gene codificante calcio ATPasi di membrana, aumentata secrezione di proteine all'esterno della cellula) con plasmidi contenenti cDNA dell'acetilcolinesterasi murina con esone 5 (esistono due forme di AchE derivanti da splicing alternativo: quella con l'esone 5 si ancora a GPI = glicosilfosfatidilinositolo che gli permette di rimanere associata alla membrana citoplasmatica, mentre quella con l'esone 6 viene secreta all'esterno della cellula) sotto il controllo di un promotore inducibile da galattosio.

Dopo aver effettuato un controllo sull'attività (espressione) di AchE nei due ceppi cresciuti su terreni con glucosio o galattosio, si è dimostrato che questa sia maggiore nel caso di crescita su galattosio ed in particolare nel ceppo Klpmr1delta; l'utilizzo di inibitori dell'attività esterasica ha inoltre evidenziato una notevole riduzione dell'espressione di AchE in entrambi i ceppi.

## 3. RECUPERO DI METALLI PESANTI

Tecnica sfruttata soprattutto per il recupero delle "terre rare" = 17 metalli con caratteristiche fisiche molto simili, utilizzati per lo più in superleghe, catalizzatori nelle ceramiche e nei condensatori, il cui recupero/riciclo è molto importante proprio perché sono rari. Questo avviene principalmente per due tecniche:

- **Bioaccumulo** → uptake dall'esterno di questi elementi, pertanto le cellule devono essere vive ed avere trasportatori specifici; principale problema consiste nel limite imposto dalla resistenza della cellula
- **Bioadsorbimento** → processo passivo, in quanto i metalli si depositano all'esterno delle cellule legando specifici recettori (elimina il problema del bioaccumulo e facilita anche il recupero).

Tecnica prediletta, viene applicata ingegnerizzando ceppi di lieviti con **proteine chimeriche** rappresentate dall'unione di una parte di "segnale" per il trasferimento all'esterno o nella membrana ("carrier", non deve interferire con il recettore) ed un'altra parte costituita dal recettore vero e proprio ("passenger", non deve interferire con la traslocazione).

Esempi nel recupero di lantanio: sono stati analizzati principalmente due costrutti chimerici costituiti entrambi da **calmodulina** come target (il lantanio avendo conformazione sterica simile al calcio può andare a legarsi nei siti di legame) e come carrier uno con la proteina **GAS1** (ancorata a livello della membrana che protrude all'esterno) e l'altro con la proteina **PIR4** (si lega alle glicoproteine di membrana sulla superficie esterna della parete); successivamente si è analizzata per western blot l'espressione di tali chimere in ceppi wt contro ceppi mutati e si è trovata la condizione ideale per tali processi di recupero (ceppo OCH1delta).

## **C. ELEGANS COME BIOSENSORE**

Organismo nematode pluricellulare utilizzato in quanto: bassi costi di mantenimento, grande, trasparente, coltivabile su petri o in terreno liquido, ermafrodita (può produrre fino a 400 individui), genoma totalmente sequenziato, 35% di omologia con geni umani, può essere congelato. **Ciclo vitale**: l'embrione si schiude in larva, questa si accresce passando per 4 stadi larvali (differenziamento dei tessuti; allo stadio di larva L2 in caso di scarsità di nutrienti, può trasformarsi in "dauer" che è come una specie di sporra = resiste per mesi senza cibo e acqua e quando viene rimessa in coltura riprende il ciclo vitale) e dallo stato L4 passa infine ad organismo adulto nel momento in cui comincia a deporre embrioni.

### **1. MISURAZIONE DELLA TOSSICITA' DEI BISFENOLI**

Utilizzati (soprattutto bisfenolo A) come componente di varie plastiche in quanto conferiva rigidità (es. scontrini), ma si è scoperto essere cancerogeno ed interferire con fertilità e sistema endocrino. Tecniche di misurazione:

- **Comet assay** → si osserva la transizione mediante fluorimetria del nucleo da uno stato compatto con confini ben definiti, ad una colorazione diffusa come fosse una cometa (indice del grado di degradazione del DNA = genotossicità); questa analisi dimostra che i bisfenoli sono tossici anche a bassissime concentrazioni
- **Induzione di apoptosi** → anche in questo caso si ha aumento di tossicità in seguito a trattamento con bisfenoli
- **Risposta a stress ossidativo** → il sistema è in grado di rispondere allo stress ossidativo inducendo l'espressione di geni coinvolti nel contrastare l'attività delle specie reattive dell'ossigeno. In seguito ad aver ingegnerizzato tali geni con la sequenza per GFP si è andato a vedere in quale modo veniva influenzata l'intensità di segnale (quindi l'espressione) in seguito a trattamento con bisfenoli = c'è aumento di fluorescenza quindi tossicità

## LIEVITI E MUFFE (FUNGHI)

I funghi sono un regno di organismi eucarioti unicellulari e pluricellulari; possono essere classificati in: basidiomiceti (di grandi dimensioni, quelli che normalmente si mangiano), ascomiceti (lieviti e funghi filamentosi come *S. Cerevisiae*), zigomiceti (muffe del pane) e deuteromiceti (funghi imperfetti, di cui non è ancora stato ben definito il ciclo cellulare; ne fanno parte penicilli per la produzione di antibiotici e aspergilli per la produzione di proteine eterologhe).

### LIEVITI

Gruppo di funghi unicellulari di dimensioni variabili e forma per lo più sferica (può variare sia tra specie diverse che per la stessa specie), contraddistinti dalla presenza di una **parete cellulare** = dona rigidità e struttura, protegge la cellula dall'ambiente esterno, possiede caratteristiche che la rendono particolarmente utile nelle applicazioni industriali (responsabile del processo di flocculazione, per cui quando raggiungono alte concentrazioni i lieviti si aggregano e precipitano sul fondo della coltura; utile nel recupero della biomassa), occupa il 20% del peso secco della cellula ed è organizzata in 3 strati (mannano, proteine e chinina + glucano + proteine e lipidi; glucano polimero di glucosio e mannano polimero di mannosio, legato a peptidi per NAG).

In generale i lieviti possono riprodursi per 2 modi:

- **Gemmazione** → si forma una gemma come estroflessione della cellula madre, da cui poi si distacca a formare una nuova cellula figlia (sulla cellula madre è possibile vedere tante "cicatrici" di chitina quante sono state le gemmazioni cui è andata incontro)
- **Scissione binaria** → per cui durante la mitosi si forma un setto centrale che al termine del processo divide la cellula madre in due cellule figlie completamente identiche

Possiedono 2 tipi sessuali **α** ed **alfa** a seconda dell'informazione genetica contenuta nel locus "**mat**" (due varianti) e possono andare incontro a crescita vegetativa sia allo **stato aploide** che **diploide** (sono cellule stabili in entrambi i casi, ma la aploide si riproduce solo in seguito ad essersi unita con un'altra cellula aploide e dunque essere diventata diploide). La cellula diploide ha la particolarità di essere stabile fin quando non viene messa in condizioni di stress (generalmente variazioni ambientali che riguardano soprattutto la disponibilità di fonti di carbonio ed azoto), situazione che stimola il "rimescolamento genico" e porta la cellula ad andare incontro a meiosi = si vengono a formare 4 spore aploidi rinchiusi all'interno di un sacco denominato "asco" o "basidio", all'interno del quale rimangono fin quando le condizioni ambientali non tornano ad essere favorevoli.

A seconda della disponibilità di ossigeno possono avere metabolismo fermentativo (lieviti fermentativi, anaerobi facoltativi quale *kluveromyces*) o respirativo (lieviti respirativi, aerobi obbligati quale *saccharomyces cerevisiae*); a questo proposito è importante soffermarsi su un intermedio metabolico quale il piruvato (prodotto al termine della glicolisi), che a seconda del tipo di metabolismo può avere diversi destini: in condizioni respirative viene decarbossilato ossidativamente ad acetil-CoA ed entrare nel ciclo di krebs (nel mitocondrio), in condizioni fermentative viene decarbossilato ad acetaldeide (nel citoplasma, da cui poi può intraprendere la via etanolergica e quindi ridotta ad etanolo, oppure la via "anaplerotica" del bypass del piruvato e quindi ossidata prima in acetato ed infine convertita in acetil-CoA). Determinanti nel destino del piruvato e quindi nel tipo di metabolismo del lievito sono due effetti metabolici:

- **Effetto pasteur** (lieviti respirativi) = determina la capacità delle cellule di metabolizzare le fonti di carbonio per via respirativa quando in presenza di ossigeno; è dovuto alla diversa affinità per il piruvato degli enzimi piruvato deidrogenasi (più alta, decarbossilazione ossidativa) e piruvato decarbossilasi (più bassa, viene attivata solo quando è raggiunta la soglia di saturazione per la piruvato deidrogenasi)
- **Effetto crabtree** (lieviti fermentativi) = o repressione da glucosio, per cui superate determinate concentrazioni di glucosio nel mezzo, viene repressa sia l'attività enzimatica che la trascrizione degli enzimi della respirazione, anche in presenza di ossigeno (è importante ricordare che a prescindere da tutto, il lievito ha comunque bisogno di ossigeno in quanto importante per altre funzioni vitali)

**SACCHAROMYCES CEREVISIAE** → lievito gemmante eucariotico unicellulare, importante dal punto di vista applicativo in quanto:

- Primo organismo eucariotico ad essere stato totalmente sequenziato, si conosce perfettamente fisiologia e struttura del genoma, è facilmente ingegnerizzabile con DNA eterologo (ricombinazione omologa molto efficiente)
- Cresce rapidamente sia in forma aploide che diploide (circa una divisione ogni 90 minuti, varia a seconda della disponibilità e del tipo di fonte di carbonio) ed è economico da mantenere (substrati da scarti di lavorazioni industriali)
- Caratterizzato da metabolismo di tipo fermentativo, viene sfruttato in campo alimentare per la capacità di produrre ed accumulare etanolo ed anidride carbonica a termine del processo etanolergico
- Condivide molti geni con l'uomo, pertanto conserva caratteristiche funzionali e metaboliche (modello utile per studiare funzioni di cellule superiori)

È dunque la specie più utilizzata tra i lieviti sfruttati nelle produzioni industriali (subphylum saccharomycotina, famiglia delle saccharomycetaceae)

### APPLICAZIONI INDUSTRIALI

È importante in questo campo il concetto di **adomesticamento** = selezione artificiale ed allevamento di specie selvatiche al fine di ottenerne di nuove con caratteristiche desiderabili migliorate (dovute a cambiamenti genetici quali amplificazioni, delezioni, variazioni cromosomiche ecc...) che prosperino in ambienti artificiali (si accompagna al fenomeno di decadimento genomico per tutti quei geni utili al lievito in situazioni di pressione selettiva ambientale, di competizione tra specie) come nel caso del fermentatore.

#### **1. PANIFICAZIONE**

Quindi l'obiettivo del lievito è quello di far lievitare il pane mediante la produzione di anidride carbonica. si distingue tra:

- **Lievito madre** = massa arricchita ogni giorno con acqua e farina, all'interno della quale si viene a selezionare un microbiota stabile (per lo più costituito da una cellula di lievito ogni 100 cellule di batteri lattici)
- **Lievito industriale** = formato da una microcoltura selezionata al fine di avere particolari caratteristiche migliorative (rapida e massima produzione di CO<sub>2</sub> in aerobiosi in modo da evitare produzione di etanolo, stabilità biochimica, mantenere capacità fermentativa in bassa quantità di acqua e a temperatura ambiente, conservabilità a 4 °C)

#### **2. PRODUZIONE DELLA BIRRA**

Processo altamente regolato in termini di tipologia e quantità di materie prime utilizzare, ceppi di lievito e contenuto in zucchero nel mosto (= terreno di coltura; c'è una stretta relazione tra il contenuto di zucchero nel terreno e quello alcolico nella birra ed è per questo che si parla di gradazione saccarometrica, la quale viene misurata in gradi plato: °P peso identifica i grammi di zucchero per 100g di mosto e °P volume i grammi di zucchero in 100ml di mosto; un grado saccarometrico equivale a circa 2,1 gradi alcolici).

- **Lieviti di birra** → i lieviti utilizzati nel processo devono avere **determinate caratteristiche**: alto rendimento (rapidità nell'utilizzare le fonti di carbonio per produrre etanolo, solitamente si usano zuccheri derivati dall'idrolisi dell'amido in quanto la maggior parte dei lieviti non possiede amilasi), capacità di flocculare (quindi precipitare raggiunta una certa concentrazione, facilitando il processo di chiarificazione; la flocculazione è un processo che avviene per interazioni tipo antigene-anticorpo tra flocculine e proteine mannosilate presenti sulle pareti dei lieviti), alta capacità di fermentazione (quindi anche repressione da catabolita), resistenza ad alte temperature (fermentazione è un processo esoergonico) e bassi pH (lavorare a pH acido consente di ridurre la presenza di contaminanti).

Per quanto riguarda i **tipi di lievito**, si distingue principalmente tra lieviti:

- **LAGER** = o "lieviti bassi" (basse temperature e quando precipitano si sedimentano sul fondo del fermentatore), sono ceppi ibridi interspecifici che derivano dall'unione di *S. Eubayanus* (da cui si

prende la tolleranza alla fermentazione a basse temperature) e *S.Cerevisiae* (da cui si prende la capacità di fermentare tutti gli zuccheri presenti nel mosto), i quali danno come risultato gli allotriploidi *S.Carlsbergensis* o *S.Pastorianus*.

- **ALE** = o “lieviti alti” (alte temperature e durante la crescita tendono a formare strutture pseudo miceliali sulla superficie del terreno di fermentazione), sono monoculture di *S.Cerevisiae*.

Processi di addomesticamento: capacità di utilizzare maltotrioso (secondo in abbondanza dopo il maltosio, generalmente utilizzato con bassa affinità dalle specie naturali), incapacità di produrre 4-vinilguaiacolo (composto aromatico con sapore speziato normalmente non desiderato nella birra; mutazioni non senso nelle regioni che codificano per gli enzimi) ed incapacità di effettuare sporulazione (altrimenti si avrebbe variazione del corredo genetico; capacità persa date le condizioni favorevoli create artificialmente nel fermentatore)

- **Materie prime** → determinanti nelle caratteristiche organolettiche e gradazione alcolica, sono: ACQUA (potabile, batteriologicamente pura e di specifica durezza, influenza i processi finali quali chiarificazione, filtrazione e stabilità del prodotto), MALTO (fonte di amido, amilasi e proteasi, prodotto a partire da semi di orzo germinati e lavorati: semi posti nel germinatoio a umidità e temperatura controllate, una volta germinato si blocca la crescita ponendolo in un essiccatoio, in questa fase si ha la massima quantità di amido + amilasi e proteasi ancora non attivate, una volta che il germoglio è morto si effettua tostatura, la quale determinerà il colore della birra scura o chiara ed infine si effettua setacciatura per separare i chicchi dal germoglio), AGGIUNTE (fonti di amido diverse dal malto fino ad un massimo del 40% rispetto ad esso, forniscono zuccheri al mosto ma non sono responsabili di aumento della gradazione saccarometrica) e LUPPOLO (infiorescenza del *humulus lupulus*, aggiunge le tipiche caratteristiche organolettiche ed ha effetti chiarificanti in quanto precipitante naturale di proteine e disinfettante contro insorgenza di contaminanti per fermentazioni secondarie)

Processo:

1. **Preparazione del mosto** → terreno di coltura per la crescita e la fermentazione del lievito, può essere preparato secondo due tecniche:
  - Per infusione = si ha il malto inizialmente sospeso in acqua e si divide in due fasi: una prima di **attivazione della proteolisi** per incubazione del mosto totale a 40-45 °C ed una seconda di “**saccarificazione**” dell’amido per aumento delle temperature oltre i 60 °C (a temperature più alte si attivano le alfa amilasi che portano all’accumulo di destrine, zuccheri non fermentanti e quindi birra poco alcolica; a temperature più basse invece vengono attivate le beta amilasi che portano all’accumulo di maltosio, zucchero fermentante e quindi birra più alcolica)
  - Per decozione = processo simile all’infusione (stesse fasi), ma che prevede di portare ad **ebollizione 1/3 del mosto totale**, per poi aggiungerlo ai restanti 2/3 e lasciar riposare fin quando viene raggiunta la temperatura desiderata (permette di saccarificare più amido possibile), senza alterare le caratteristiche organolettiche.

Al termine di questi processi (solubilizzazione e saccarificazione dell’amido) viene aggiunto il luppolo e si porta il mosto ad ebollizione (precipitano le proteine non più necessarie e vengono solubilizzate le resine del luppolo); successivamente si filtra il tutto ed infine si raffredda a 10-15 °C (per prepararlo alla fermentazione)

2. **Fermentazione** → si divide in primaria (in fermentatori di acciaio per 5-10 giorni, 150 litri di mosto chiarificato e 0,5 Kg di lievito; il maltosio è convertito in etanolo e mosto in birra) e secondaria (a basse temperature ed umidità controllata in vasche di invecchiamento/stagionatura, in cui si ha fermentazione del lievito residuo, arricchimento in CO<sub>2</sub> – proprietà antisettiche ed antibatteriche – e acquisizione di caratteristiche organolettiche)
3. **Chiarificazione** → eliminazione per filtrazione della biomassa sfruttando la flocculazione e coagulazione delle proteine
4. **Imbottigliamento e pasteurizzazione** → a 70 °C prima di essere distribuite

### 3. PROBIOTICI

I probiotici sono definiti come organismi vivi che somministrati in quantità adeguate conferiscono all'ospite un beneficio per la salute; sotto questo punto di vista, i lieviti possono essere somministrati come componente del microbiota intestinale, in quanto già presenti (seppur con una percentuale molto bassa rispetto al totale).

Diversi studi hanno identificato *Saccharomyces boulardii* come ottimo probiotico in quanto, in seguito a selezione in laboratorio (effettuata preponendosi determinati target) e test clinici, si è visto avere capacità di:

- Crescere su substrati idrofobici e a pH molto bassi (come la mucosa gastrointestinale)
- Aggregarsi nel formare biofilm (ricopre la mucosa e la protegge)
- Antibiotico resistenza di tipo cromosomale (a differenza di quella batterica che è di tipo plasmidico, pertanto possono avvenire eventi di trasferimento orizzontale)
- Capacità antimicrobiche (creare una barriera contro agenti patogeni)