

I GEORGOFILI

Quaderni
2022-II



I MICROBI NELLA TRANSIZIONE ECOLOGICA ED ENERGETICA

21 giugno 2022

Società  Editrice Fiorentina

Con il contributo di



FONDAZIONE
CR FIRENZE



DIREZIONE GENERALE
EDUCAZIONE,
RICERCA E
ISTITUTI CULTURALI

Copyright © 2023
Accademia dei Georgofili
Firenze
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti della Accademia dei Georgofili»
Anno 2022 - Serie VIII - Vol. 19 (198° dall'inizio)

Direttore responsabile: Paolo Nanni

SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA
via Aretina, 298 - 50136 Firenze
tel. 055 5532924
info@sefeditrice.it - www.sefeditrice.it

ISBN 978-88-6032-700-0

INDICE

MARCO NUTI	
<i>Prefazione</i>	7
ALDO LEPIDI	
<i>Luigi Pasteur: alle radici delle rivoluzioni verdi, antropologiche, epidemiologiche e demografiche dei nostri tempi (nel ricordo di Onorato Verona e Gino Florenzano)</i>	11
RINO RAPPUOLI	
<i>Dal vaccino antirabico ai vaccini a mRNA</i>	21
LAURA ERCOLI, ELISA PELLEGRINO	
<i>I microbi come produttori di servizi per l'agro-ecosistema: biostimolanti e biofertilizzanti</i>	23
ALESSIO GIACOMINI, CHIARA NADAI, VIVIANA CORICH	
<i>Aspettative e limitazioni nell'uso dei fermenti lattici probiotici</i>	35
VIVIANA CORICH, ALESSIO GIACOMINI, CHIARA NADAI	
<i>L'evoluzione del lievito starter per la gestione della fermentazione alcolica</i>	47
GIOVANNI VALLINI	
<i>Contributo delle biotecnologie microbiche in risposta al cambiamento climatico: bioprocessi per la decarbonizzazione e la produzione di energia rinnovabile</i>	61
SILVIA LAMPIS	
<i>I microrganismi nella decontaminazione ambientale: tendenze e limitazioni</i>	89
SIMONA DALY	
<i>I microbi nei bioprocessi industriali</i>	93

MARCO NUTI¹

Prefazione

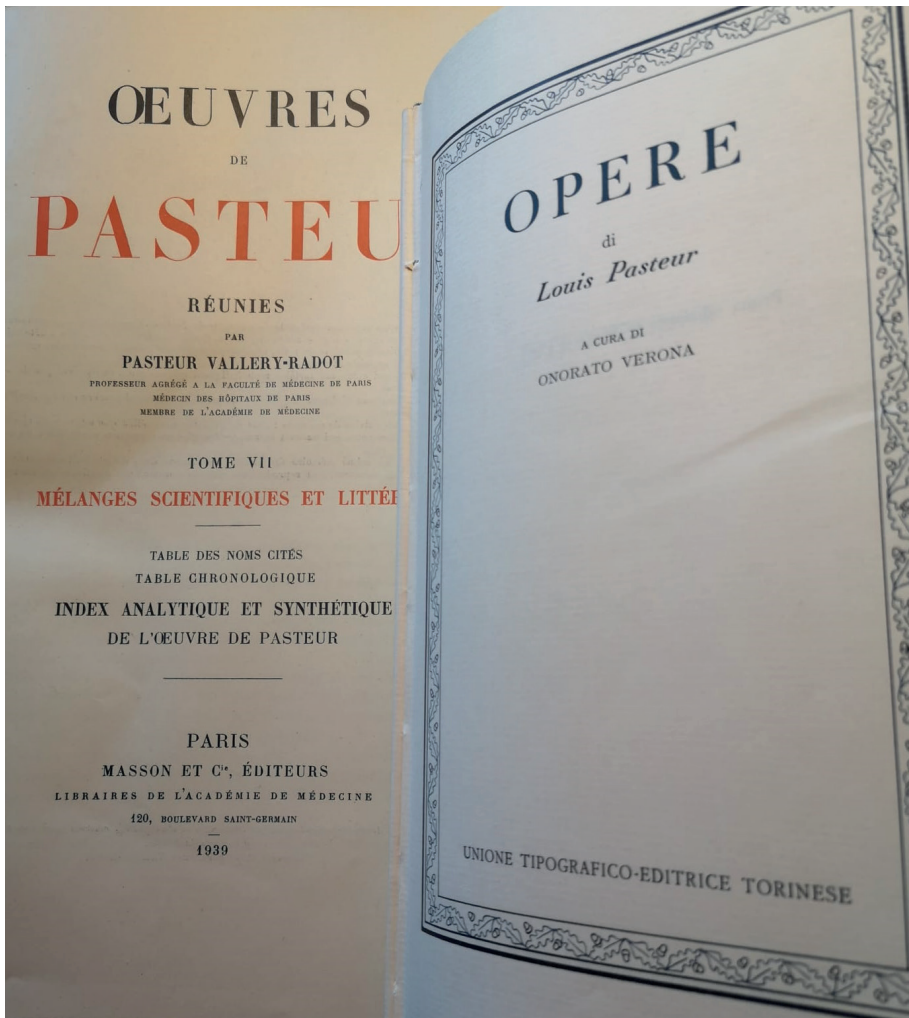
¹ Professore emerito, Università di Pisa; professore affiliato, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

Louis Pasteur nasce a Dôle, un villaggio nel Jura in Francia il 27 dicembre 1822, in una famiglia di conciatori. Laureatosi all'École Normale Supérieure nel 1847, inizia a studiare la cristallografia e le dissimetrie molecolari (dai suoi studi prende avvio la Stereochimica). Nel 1848 è professore di Fisica al Liceo di Dijon e l'anno successivo è supplente alla cattedra di Chimica all'Università di Strasbourg, sposandosi nello stesso anno con Marie Laurent. Nel 1854 è a Lille alla Facoltà di Scienze e due anni dopo inizia lo studio delle fermentazioni, in particolare per certe anomalie nella produzione di alcol da barbabietole causate da cellule allungate e sottili che sopravanzavano quelle molto più grandi dei lieviti globosi. Nella sua prima memoria del 1858 descrive così la fermentazione lattica, iniziando anche a confutare la teoria della generazione spontanea, seguita dalla *Memoria sulla fermentazione alcoolica*. All'età di 43 anni, durante questi studi sulle fermentazioni, inventa un metodo che permette la conservazione dei prodotti alimentari: il metodo che porta il suo nome, la pasteurizzazione. Gli studi sulle fermentazioni terminano nel 1867, non prima di aver individuato e descritto la fermentazione butirrica operata da fermenti che “vivono senz'aria” cioè gli anossigenici, la presenza dei microbi aderenti al pulviscolo dell'aria, la fermentazione acetica e i suoi agenti causali, gli agenti della fermentazione vinaria (*Studi sul vino, sue malattie e cause che le provocano. Nuovi procedimenti per conservarlo e invecchiarlo*). Il nesso tra agenti causali e “malattie” porta Pasteur a studiare la malattia del baco da seta per poi tornare alle malattie della birra (*Studi sulla birra*, 1876). La confutazione dell'allora imperante teoria della generazione spontanea si completa con l'uscita della *Teoria dei germi e le malattie infettive* (1878), non prima di aver dimostrato, l'anno precedente, che il carbonchio è causato da un batterio bacillare.

Nel 1881 inizia gli studi sulla rabbia, scoprendo inizialmente lo pneumococco agente causale della polmonite, affermando fin da subito che il microbo non poteva esser visto al microscopio “per la sua piccolezza infinita”. Inizia le ricerche sulla immunizzazione dalla rabbia, forte dei risultati ottenuti con l’invecchiamento delle colture dell’agente del colera dei polli. Il 4 luglio 1885, nel villaggio di Maisongoutte in Alsazia, il giovane Joseph Meister sta andando tranquillamente a prendere del lievito per la panificazione quando il cane del signor Vonné, lo speciale, lo assale mordendogli la mano destra e le cosce. Il cane, riconosciuto come rabbioso, viene abbattuto. Il ragazzo viene portato dal dottor Weber che gli disinfetta le ferite e decide di mandarlo a Parigi. Il ragazzo arriva al laboratorio di Pasteur, allora in rue d’Ulm, insieme alla madre e al proprietario del cane. Quest’ultimo viene rassicurato da Pasteur in persona in quanto non presenta segni di morsi, forse gli abiti lo hanno protetto. Che fare? Émile Roux è titubante, uno scacco potrebbe compromettere tutto ciò che era stato fatto fino ad allora, ma Pasteur, confidando in una reazione degli esseri umani simile a quella da lui riscontrata nei cani e nei conigli, decide di trattare il ragazzo morso dal cane rabbioso la cui fine sarebbe altrimenti segnata. Il 6 luglio, alle otto di sera, Joseph Meister riceve la prima puntura preparata con midollo di coniglio morto di rabbia due settimane prima e lasciato invecchiare ed essiccare. Seguono le altre punture fino al 25 agosto con midollo sempre più fresco. La somministrazione del vaccino antirabico, prodotto con la tecnica dell’invecchiamento delle colture insieme al collaboratore Émile Roux (destinato a succedergli alla direzione dell’Istituto Pasteur), consente a Joseph Meister di sopravvivere consegnando così Louis Pasteur alla Storia.

Lo zar di Russia e l’imperatore del Brasile partecipano alla creazione nel 1888 dell’Institut Pasteur a Parigi nell’odierna rue du Dr Roux. Nello stesso anno accoglie nel suo gruppo interdisciplinare di ricercatori Ilya Metschnikoff, lo scopritore della fagocitosi. Pasteur si spegne nel 1895 all’età di 72 anni. Il genero René Valléry-Radot raccoglie le Memorie di Pasteur che saranno poi pubblicate nel 1939 con i tipi della Masson a Parigi. Nel mondo sono oggi operativi 11 Istituti Pasteur in Africa e Medioriente, 8 in Estremo Oriente, 1 in Nuova Caledonia e 1 in Canada, 4 in America del Sud e Caribe. Il suo successore alla guida dell’Institut Pasteur, Émile Roux, pochi anni dopo accoglie Serghej Winogradsky, fondatore della Microbiologia del suolo. Ancora oggi la pandemia del Covid trova nei due pilastri dell’igiene e della vaccinazione un formidabile argine per la nostra salute...

Le relazioni che seguono, tenute al Convegno nella sede dell’Accademia dei Georgofili in occasione del 200^{mo} anniversario della nascita di Pasteur, ripercorrono le tappe fondamentali di questo gigante della ricerca scientifica,



universalmente riconosciuto come il fondatore della microbiologia e delle sue varie branche, per paragonare i risultati di allora con quelli di oggi nell'epoca della transizione ecologica ed energetica.

ALDO LEPIDI¹

Luigi Pasteur: alle radici delle rivoluzioni verdi, antropologiche, epidemiologiche e demografiche dei nostri tempi (nel ricordo di Onorato Verona e Gino Florenzano)

¹ Università dell'Aquila

LOUIS PASTEUR

Grandi scienziati, riconosciuti come tali per generazioni e generazioni, sono quelli che oltre ad avere grandi meriti scientifici hanno la fortuna di operare nel momento giusto e nel modo giusto perché la loro opera abbia grandi effetti nella cultura e nella società.

L'Accademia dei Georgofili celebra nel 2022 il secondo centenario dalla nascita di Louis Pasteur, grande scienziato e grande uomo che con l'Accademia condivide spirito e valori.

L'Institut Pasteur, depositario della sua memoria ed erede della sua opera, celebra la ricorrenza dedicandola a tre ambizioni che la sua vita e i suoi scritti fanno riconoscere come "spirito di Pasteur":

1. utilizzare in modo vigoroso l'approccio scientifico basato sullo studio, rigore, spirito critico, prove ottenute sperimentalmente, perseveranza;
2. ferma convinzione circa il carattere umanistico e universale, circa il ruolo e le finalità della scienza nella società e nel mondo; in altre parole, a rischio di sembrare utopico, la scienza deve essere dedicata a migliorare la salute di tutti nel mondo;
3. infine il desiderio di trasmettere alle future generazioni non solo la conoscenza scientifica attraverso l'educazione e la formazione, bensì anche il modo di condurre la ricerca con la preoccupazione di migliorare la salute umana (<https://www.pasteur.fr/en/bicentenary-2022>).

IL PRIMO CENTENARIO: I MICROBI INFETTIVI

La seconda delle suddette tre ambizioni (ferma convinzione che la Scienza e la Microbiologia in specie abbiano ruoli, obiettivi e responsabilità nella qualità della vita dell'intera umanità) non figura tra le eredità di Pasteur riconosciute nelle celebrazioni del 1922, primo centenario della nascita dello scienziato. Gli atti e le memorie pubblicate nell'occasione ricordano Pasteur in modo quasi esclusivo per i lavori pionieristici dedicati alle malattie infettive, tralasciando altri ambiti di ricerca che pure sono presenti e fondamentali nei lavori dello scienziato. In quegli anni, del resto, c'erano solide ragioni per dare priorità alle malattie infettive: la transizione epidemiologica avrebbe avuto inizio non prima di un mezzo secolo, le malattie infettive erano nemici senza appello: la Spagnola aveva appena devastato l'intero pianeta e il morbillo, la tubercolosi, la lebbra, la sepsi e tante altre ancora erano incubi di ogni giorno.

IL SESQUICENTENARIO: AGRO-INDUSTRIA, SUOLO, ANTIBIOTICI

Nel 1972, per i 150 anni dalla nascita dello scienziato la copertina di «Science» riporta un meraviglioso dipinto per mano di Pasteur: il ritratto di Pierre-Joseph Gaidot, bottaio di Arbois, un acquerello del 1838 quando, giovanissimo, seguiva ancora una precoce vocazione di pittore (https://artsandculture.google.com/asset/pierre-joseph-gaidot-a-cooper-in-arbois-louis-pasteur/1wFG_GtFZvb3TQ?hl=fr). Le celebrazioni pasteuriane si susseguono in quell'anno in molti Paesi con convegni, giornate di società scientifiche, collane di pubblicazioni, francobolli. Da noi in Italia, Onorato Verona consegna alle stampe, con i tipi della UTET, un *opus magnum* (*Opere* di Louis Pasteur) in cui ricostruisce, in modo fedele e appassionato, i percorsi mentali, metodologici e morali con cui Pasteur apre orizzonti innovativi in ambiti diversi delle conoscenze, microbiologiche e non solo. Il poderoso lavoro di Verona evidenzia e valorizza dettagli della forte e complessa personalità dello scienziato, le sue passioni, i suoi ideali, la sua vita e il suo animo. In tanti altri Paesi si daranno alle stampe edizioni dedicate a Pasteur e traduzioni delle sue opere.

Le celebrazioni pasteuriane nel 1972 avvengono in un ambiente culturale e in un quadro di realtà sociali diversi da quelli del 1922. Il mondo, scientifico e non, è cambiato e sta seguitando a cambiare da tanti punti di vista. Per quanto di interesse in questa sede e a solo titolo indicativo possiamo citare alcune delle novità importanti allora intervenute:

- la scoperta dei virus e la descrizione di interi nuovi ordini di batteri, lieviti e muffe danno dei microbi una visione nuova e ricca di potenzialità conoscitive e applicative soprattutto nell'agricoltura e nell'alimentazione;
- un modo nuovo di vedere i batteri e i microbi in generale che sono considerati non più solo o fondamentalmente come agenti patogeni ma quali primi attori in eventi fondamentali per la produzione di beni (agro-alimentare, farmaci) e servizi (depurazione, cicli biologici, fertilizzanti...). Già nel 1946, Verona aveva dato alle stampe con i tipi della Vallerini un significativo volumetto che nel titolo poneva la domanda *I Microbi sono veramente dannosi?*, in cui descrive alcuni casi emblematici, ma sottovalutati o ignorati, di enormi benefici realizzati dalle attività microbiche. Florenzano qualche tempo dopo avrebbe ripreso il concetto in una memoria dal titolo *I Macroefferetti dei nostri Microamici*. Questi due scienziati e maestri (Verona e Florenzano), proprio in coincidenza con il sesquicentenario di Pasteur avrebbero portato a realizzazione in Italia due scuole di Microbiologia di diretta ispirazione pasteuriana con il riconoscimento da parte del CNR di due Centri di Studio dedicati appunto alla Microbiologia ambientale, agraria e alimentare: il Centro di Studi per la Microbiologia del Suolo (a Pisa) e il Centro di Studio dei Microrganismi autotrofi (a Firenze). Questi Centri avrebbero dato un prezioso contributo alle nostre strutture universitarie che stavano faticosamente agganciando la ricerca italiana alle cordate internazionali di maggior successo;
- l'utilizzo della genetica e della fisiologia microbica (nel quadro di una ormai solida consapevolezza dell'unicità del mondo dei viventi) quali modelli per migliorare piante coltivate e animali allevati, per razionalizzare l'alimentazione umana e zootecnica e quali strumenti per l'agro-industria, la farmaceutica e le nascenti produzioni biotecnologiche;
- l'uso terapeutico degli antibiotici e le vaccinazioni di massa sono la solida base di una nuova sanità e, assieme alle conoscenze sulla nutrizione, di un nuovo modo di intendere la qualità della vita e il benessere delle persone e delle società.

Nel 1972 erano già attive, ma non avevano ancora espletato pienamente i loro effetti, la rivoluzione verde, la transizione epidemiologica e la transizione demografica. A 50 anni di distanza, siamo testimoni della profondità delle trasformazioni intervenute nel campo alimentare, in quello delle malattie (trasmissibili e non), come pure nella struttura e nell'organizzazione interna delle nostre popolazioni.

IL BICENTENARIO DEL 2022: TRANSIZIONI E RIVOLUZIONI

*jusqu'au moment où vous aurez peut-être cet immense bonheur
de penser que vous avez contribué en quelque chose
au progrès et au bien de l'humanité*

Louis Pasteur alla Sorbona

27 dicembre 1892, giubileo per i suoi 70 anni

Le celebrazioni programmate dall'Institut Pasteur, di cui abbiamo parlato in apertura, sottolineano il solido collegamento che Pasteur stabiliva tra modi nuovi e più efficaci di fare scienza con l'ambizione di dare all'umanità nuovi, più nobili e più efficaci orizzonti umanistici e umanitari. Il bicentenario di Pasteur sta coincidendo con la pandemia di Covid-19 il cui controllo vede un ruolo inestimabile per vaccini innovativi, ottenuti con percorsi costellati di genialità e passione nello stile pasteuriano.

L'intero periodo dei 50 anni trascorsi dopo il 1972 è stato intenso come pochi con trasformazioni che rimodellano profondamente la vita e il futuro di tutti gli esseri umani e rendono prezioso il collegamento che Pasteur stabiliva tra la scienza e la soluzione di problemi di primario rilievo per l'umanità. In estrema sintesi possiamo riassumere queste trasformazioni in questi due punti:

- le rivoluzioni ICT e biomolecolare, dopo la ottocentesca rivoluzione termica e quella elettrica del XX secolo, stanno rifondando alla radice aspetti basilari della vita umana;
- consumi non regolati di energie e di materiali, secondo modelli di sfruttamento basati sul profitto individuale, pregiudicano le qualità fisiche chimiche e biologiche dell'ambiente Terra con estinzioni di massa di cui potrebbe restare vittima lo stesso *Homo sapiens*.

Queste trasformazioni formano intrecci difficili da comprendere e da governare. Alcune di esse, di impatto diretto su specifici aspetti della vita delle persone, delle società e degli Stati sono state chiaramente individuate a livello internazionale (scientifico e geopolitico) e sono indicate con specifiche denominazioni: rivoluzione o transizione variamente aggettivata (demografica, epidemiologica, verde o alimentare, climatica, ecologica, industriale, socio-economica ...).

Si tratta di numerose realtà composite e complesse, evidentemente il risultato di numerose concause. Tra quelli che l'analisi fattoriale definirebbe "fattori principali" vanno messe senza dubbio l'alimentazione e la salute, indicate nelle dizioni rivoluzione verde e transizione epidemiologica. Il superamento

della fame endemica o ricorrente e del prevalere delle malattie infettive quale causa più frequente di morte sono effettivamente “fattori principali” che la scienza ha consentito di ottenere per la prima volta nell’ultimo mezzo secolo.

Entrambe queste fondamentali novità che plasmano la nostra epoca hanno radici in conquiste conoscitive e tecnologiche nelle quali è riconoscibile e documentabile storicamente, in modo diretto o indiretto, l’impostazione (*imprinting*) data alle discipline microbiologiche dai padri fondatori, con Luigi Pasteur in una indiscussa posizione dominante. Norman Borlaugh, il padre della Rivoluzione Verde (RV), aveva come citazione preferita una frase di Pasteur «la chance ne sourit qu’aux esprits bien préparés». Nella traduzione dello stesso Borlaugh: «luck favours only prepared mind».

Per RV si intende l’insieme di innovazioni agronomiche basate sulla scienza moderna (con specifico rilievo per il miglioramento delle cultivars e l’ottimizzazione della loro nutrizione) da cui sono derivati aumenti impressionanti della produttività agricola soprattutto nelle aree irrigue e naturalmente fertili. La RV si è diversificata a seconda delle aree geografiche e seguita a evolvere per moderare o rimuovere alcuni problemi derivati dalla sua applicazione. Adeguamenti recenti, indicati come RV 2.0, assomigliano a una rifondazione dell’agricoltura, realizzata integrando conoscenze e tecnologie dalla genomica alle applicazioni informatiche.

L’aumento della disponibilità e la standardizzazione della qualità dei prodotti primari ha favorito l’espansione senza precedenti della loro conservazione, trasformazione e commercializzazione su scala praticamente planetaria (la grande trasformazione alimentare e la grande distribuzione alimentare).

L’uomo è l’unico eterotrofo capace di produrre il proprio alimento. Lo ha fatto dapprima in modo empirico e limitato per mano degli agricoltori e dei pastori e poi, in modo molto più efficace, con i contributi della scienza e delle tecnologie. I dissapori tra Caino, “il coltivatore”, e Abele, “il pascolatore” (emblematici della competizione plurimillennaria per l’uso del territorio), sono messi in ombra dall’appropriazione che la trasformazione-distribuzione sta facendo nei confronti delle produzioni agricola e zootecnica alle quali viene sottratta una quota maggioritaria del controllo della filiera che porta alla disponibilità alimentare. L’antica preziosa madia che custodiva pane e formaggio di casa, è sostituita dai chilometri di scaffalature dei tanti supermercati, ipermercati, minimercati... che a partire dal Piggly Wiggly di Memphis (TN), aperto nel 1916, traboccano di migliaia di prodotti alimentari a tutte le latitudini. Pur con alcune storture da rimediare (tra cui le pratiche commerciali che manomettono l’equa ripartizione dei proventi e la dannosa promozione dei cibi spazzatura) in questi ultimi decenni il contributo dell’agro-industria al mantenimento e all’accrescimento del valore nutrizionale e commerciale

degli alimenti supera di diverse grandezze quello della produzione primaria (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4116081/>).

E infatti, nel 2021 il valore del prodotto lordo/anno delle produzioni vegetali e zootecniche su scala globale è stimato intorno a 3.500 miliardi di \$ (<https://www.fao.org/3/cb4477en/cb4477en.pdf>) mentre il valore del mercato degli alimenti, a valle della trasformazione e della commercializzazione, è stimato tra 12.000 e 16.000 miliardi di \$ (<https://voxeu.org/article/structural-transformation-era-global-agricultural-value-chains>).

La complementazione ormai dominante tra la grande distribuzione alimentare e la sua associata, la grande trasformazione alimentare sta modificando le politiche delle agenzie ONU preposte alla sicurezza alimentare.

In particolare, UNIDO (United Nations Industrial Development Organization) nell'ambito dei SDGs (Sustainable Development Goals fino al 2030) promuove la diffusione di Parchi Agro-industriali Integrati (IAIP nell'acronimo inglese) e fornisce completa assistenza alla loro realizzazione. Agricoltori e allevatori garantiscono i propri interessi diventando protagonisti della trasformazione/commercializzazione dei loro prodotti primari (<https://www.unido.org/integrated-agro-industrial-parks>).

La FAO, nei limiti delle sue competenze istituzionali, condivide gli obiettivi e i programmi dei SDGs (<https://www.fao.org/publications/sofa/sofa-2021/en/>) e li finalizza a promuovere la “food security” assieme alla “food safety”: la garanzia universale di accesso a una alimentazione adeguata, sufficiente e di elevata qualità nutrizionale.

Ai prodotti della terra si aggiungono i prodotti dei prodotti della terra. Agricoltura e pastorizia, che hanno accompagnato le civiltà umane dai loro albori e che per questo sono il primario, si stanno evolvendo verso il “primario esteso” (con linguaggio postmoderno si potrebbe dire “primario 2.0”) un complesso modello scientifico e tecnologico che risolve i prodotti primari nelle loro componenti fisiche, chimiche e biologiche e ricomponе queste ultime moltiplicandone il valore nutrizionale, sociale, economico e geopolitico.

L'Accademia che ci ospita e che, fin dal 1753, seguita a «fare continue e ben regolate esperienze ed osservazioni, per condurre a perfezione l'Arte tanto giovevole della toscana coltivazione», ha accompagnato l'evoluzione del mondo agricolo italiano, europeo e mondiale anticipandone nel tempo fondamentali realizzazioni. È in larga parte per questo che la rivoluzione verde ha avuto una minore evidenza in quei paesi, come il nostro, nei quali le innovazioni basilari erano nate e si erano progressivamente affermate da decenni. Il passaggio verso il “primario esteso” pone all'Accademia istanze analoghe.

Il contributo della microbiologia di impronta pasteuriana, che è già importante nel primario, diventa ancora più determinante nel primario esteso dove

conservazione, trasformazione e commercializzazione sono i fattori principali da cui deriva la disponibilità e l'utilizzo degli alimenti.

Le moderne tecnologie alla base della grande trasformazione e della grande distribuzione alimentare sono diretta conseguenza delle ricerche pionieristiche di Pasteur su fermentazioni, trattamenti termici, filtrazione, vita senza aria, stereochimica. Dopo l'eponimo dei "coltivatori" di piante e quello dei "pascolatori" di animali, con Pasteur possiamo trovare l'eponimo dei "trasformatori" che vedono nei microrganismi i contributori prioritari.

Come nel caso delle ricerche sulla microbiologia sanitaria, anche nella trasformazione degli alimenti risulta con tutta evidenza la natura esponenziale degli effetti euristici e pratici delle ricerche di Pasteur che seguitano a dare frutti sempre crescenti con il passare del tempo.

Ancora più evidente è il collegamento dell'eredità di Pasteur con la transizione epidemiologica, diverse e complesse trasformazioni della società che si realizzano con percorsi differenti ma portano al risultato di abbattere la mortalità per infezioni (soprattutto per malattie infettive) con il risultato che le cause prevalenti di mortalità diventano le patologie degenerative (diabete, ipertensione, cardiopatie, tumori ...) o altre causate dall'uomo (guerre, distruzione di risorse, incidenti...).

Pasteur è per consenso unanime uno dei più illustri precursori della transizione epidemiologica per essere egli tra i fondatori dell'epidemiologia, dell'immunologia e della prevenzione e cura delle malattie infettive.

Un contributo diretto alla transizione epidemiologica è dato dalla rete degli Institut Pasteur che è formata da 32 istituti in 25 Paesi in 5 continenti. Gli scienziati impegnati sono circa 23.000 e si occupano di poco meno di un migliaio di progetti dedicati alla tutela della salute intesa fino a qualche decennio fa come studio, prevenzione e monitoraggio delle patologie infettive ed evoluta in tempi recenti, con l'inclusione dello studio, monitoraggio e prevenzione della denutrizione e della malnutrizione, in evidente adesione alla storia personale di Pasteur e alla complessità delle sue ricerche e in coerenza con i concetti e le politiche dell'One World One Health. In questo spirito si colloca il Progetto Afribiota, sviluppato interamente nella rete degli Institut Pasteur per conoscere e prevenire la malnutrizione cronica infantile. In Italia, l'Istituto Pasteur è sostenuto dalla Fondazione Cenci Bolognetti e dalle università locali.

Una delle attività più meritorie della rete degli Institut Pasteur sparsi per il mondo è il contributo al monitoraggio (in collaborazione con il WHO, la FAO, l'OIE e altre autorità sanitarie) delle patologie infettive riemergenti (quali tbc, malaria, colera, lebbra) e delle nuove patologie infettive (AIDS, SARS, MERS, Covid, Ebola, Hendra, Nipah e le diverse decine di *spillover* si-

lenti che fanno poche vittime al momento ma che potrebbero essere distrutti da un momento all'altro). Recentemente, l'attenzione dei responsabili della sanità a vari livelli e quella degli Institut Pasteur va anche all'epidemiologia di obesità, diabete e neoplasie, considerate patologie a infettività sociale.

Le conseguenze sociali, economiche e ambientali della transizione epidemiologica, in sinergia con quelle della RV, sono epocali: le condizioni di buona salute e di benessere diffuso, mai conosciuti in precedenza si traducono in un incremento anch'esso senza precedenti della popolazione umana, indicata a sua volta come transizione demografica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2690264/>).

Fino a tempi recentissimi, la numerosità delle popolazioni umane ha seguito andamenti rigorosamente malthusiani: le risorse che la natura metteva a disposizione ne erano il rigoroso fattore limitante e in più le carestie, le pestilenze e le avversità occasionali provocavano periodici colli di bottiglia con annesso pericolo di estinzione. I dati di sequenziamento di genomi umani, inclusi quelli di reperti paleoantropologici (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2842629/>), documentano estinzioni e/o migrazioni di popolamenti umani per carestie e altre avversità.

Si stima che ai tempi di Pasteur la popolazione umana si avvicinasse a 1 miliardo, cifra questa mai raggiunta in precedenza e prossima alla portanza naturalistica fondamentale del nostro pianeta. L'attuale esplosione demografica dell'umanità, con ca. 7.8 miliardi di persone viventi, supera ripetute volte la limitazione malthusiana delle risorse disponibili in natura e anche di quelle che un'agricoltura prescientifica poteva ottenere.

L'attuale alto numero degli esseri umani, che presuppone la capacità di garantirne l'adeguata nutrizione, è comunque un tesoro prezioso che dà la massa critica necessaria per produrre e gestire quei beni e quei servizi che consentono a una parte significativa dell'umanità di condurre quella che consideriamo una vita degna di essere vissuta (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3574335/>).

E per concludere, mi piace immaginare che Pasteur, per carattere e convinzioni, non si sottrarrebbe se oggi fosse in grado di esaminare e valutare *a posteriori* le conseguenze remote delle sue ricerche. Lo aveva già fatto *a priori* nel 1859, scrivendo a suo padre subito dopo aver presentato i suoi primi risultati sulle fermentazioni alla Société Quimique:

Ce n'est pas la forme de ces deux leçons qui les a séduits, c'est le fond, l'avenir réservé à ces grands résultats, si imprévus, et qui ouvrent à la physiologie des horizons tout nouveaux. J'ai osé le dire. Car à cette hauteur toute personnalité disparaît. Il n'y a plus que le sentiment de dignité qu'inspire toujours l'amour vrai de la science.

Evidenzierrebbe, mi piace pensare, il collegamento tra le sue scoperte (e quelle che in continuità ne sono seguite) con il laborioso e problematico avanzamento verso un mondo migliore e verso una umanità migliore: più numerosa, più sana e longeva, meglio nutrita e auspicabilmente più istruita e soprattutto più vicina alla verità (a iniziare da quella scientifica) e ai valori dello spirito, ai quali Luigi Pasteur ha dedicato convintamente la propria vita.

E sarebbe giustamente e dichiaratamente orgoglioso di sé stesso: il suo rispetto della verità non gli consentirebbe false modestie.

RIASSUNTO

I 200 anni dalla nascita di Pasteur cadono in un periodo di trasformazioni della vita dell'uomo (alcune positive, altre meno), così straordinarie da essere denominate rivoluzioni/transizioni (verdi, alimentari, sanitarie, demografiche...).

Tra i fattori di queste trasformazioni, l'eredità scientifica e culturale di Pasteur è riconoscibile e significativa:

- nelle transizioni epidemiologiche e demografiche (dell'uomo, degli animali, delle piante e degli stessi microrganismi);
- nelle rivoluzioni verdi e dell'intero comparto alimentare. In Italia la rivoluzione agro-alimentare si è sviluppata in un percorso plurisecolare i cui passaggi più recenti sono stati accompagnati anche da eredità pasteuriane (es. nelle scuole di microbiologia agraria pisana e fiorentina, legate all'Accademia dei Georgofili);
- nella genesi, evoluzione e controllo di complesse tematiche ambientali che vanno assumendo, anche per cause antropiche, andamenti e dimensioni allarmanti.

Pasteur era ben consapevole, e lo dichiara in più occasioni, delle valenze complesse e basilari dei microrganismi in ambiti diversi. I microbi, allora praticamente sconosciuti, in pochi decenni sono diventati fattori chiave degli equilibri sanitari demografici alimentari, hanno rivoluzionato le scienze della vita e consentito potenti tecnologie. Anche i valori che utilizziamo per definire il nostro essere umani, oggi non possono prescindere da ciò che sappiamo dei microbi e da ciò che sappiamo fare con i microbi.

ABSTRACT

To the roots of the today's green, anthropologic, epidemiologic and demographic revolutions (and in memory of Onorato Verona and Gino Florenzano). The second centenary of Louis Pasteur's birth occurs when human kind is facing transformations (some positive, others less so) so deep to deserve the name of Revolutions/Transitions (green, nutritional, epidemiological, demographical...). Among the factors of these transformations, Pasteur's scientific and cultural legacy is recognizable and significant:

- in the Epidemiological and Demographical Transitions (of humans, animals, plants, and microorganisms);

- in Green Revolutions, including the entire food sector. In Italy the agri-food revolution developed over a millennial path, the most recent steps of which have also benefited of Pasteurian legacies (e.g. in the Pisa's and Florence's schools of agricultural microbiology, linked to the Georgofili Academy);
- in Climate Changes and related issues, also due to anthropogenic causes, that are assuming alarming trends and relevance.

Pasteur was well aware, as He declared on several occasions, of the complex and basic relevance of microorganisms in various fields. Microbes, virtually unknown at that time, in a few decades have become key factors in food availability and demographic and health balances. Their scientific knowledges are now cornerstones of life science and their technological exploitation enables powerful technologies.

Even the values allowing mankind to consider ourself as humans, are now rooted in what we know about microbes and in what we can do with microbes.

BIBLIOGRAFIA

- AMOS W. AND HOFFMAN J.I. (2010): *Evidence of two main Bottleneck Events shaped Modern human genetic Diversity*, «Proc. Biol. Sci.», 277, pp. 131-137.
- EHRlich P.R. AND EHLrich ANNE H. (2013): *Can a Collapse of global Civilization be avoided?*, «Proc. Biol. Sci.», 280, pp. 2012-2845.
- FAO (2021): *World Food and Agriculture Statistical Yearbook*, Rome.
- GALOR O. (2012): *The Demographic Transition: Causes and Consequences*, *Cliometrica*, 6, pp. 1-28.
- INSTITUT PASTEUR (2021): *The Bicentenary of Louis Pasteur Birth, Commemoration of the 2022 Bicentenary*, «The Research Journal», 12-14.
- OMRAN A.R. (2005): *The Epidemiologic Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change*, «Milbenk Quart.», 83, pp. 731-757.

RINO RAPPUOLI¹

Dal vaccino antirabico ai vaccini a mRNA

¹ GSK, Siena

(Sintesi)

La prima vaccinazione umana da parte di Louis Pasteur fu eseguita con un virus della rabbia attenuato mediante esposizione all'aria secca. Pasteur aveva sviluppato una fonte di virus virulento prelevando frammenti di midollo spinale da un cane randagio rabbioso e inoculandoli per trapanazione sotto la *dura mater* (*dura*) nel cranio di un coniglio, poi passando il virus da coniglio a coniglio 20-25 volte fino a che il virus diventò consistentemente virulento. Infine, prelevò frammenti di midollo spinale, ciascuno di lunghezza di qualche centimetro, e li espose all'aria secca, osservando la graduale diminuzione di virulenza. Lunedì 6 luglio 1885 arrivarono tre persone dall'Alsazia. Uno di loro era Joseph Meister, un ragazzo di nove anni che era stato morsicato da un cane alle 8 di mattina del 4 luglio. Il ragazzo aveva almeno 14 morsi sul corpo e la sua morte da rabbia sembrava inevitabile. La sera del 6 luglio, Pasteur inoculò nel ragazzo frammenti di midollo disidratati per 15 giorni. Joseph Meister sopravvisse all'infezione letale e Pasteur concluse che il ragazzo non solo era sopravvissuto alla rabbia da morsi del cane, ma anche all'inoculo di un virus virulento.

Il 10 gennaio 2020 il CDC cinese caricò sul sito web la sequenza genomica del SARS-CoV-2. Il giorno stesso laboratori in tutto il mondo scaricarono la sequenza da internet e usarono il computer per disegnare un gene sintetico per la proteina spike del virus. Il gene sintetico è stato poi usato per fare un mRNA interamente sintetico usando un mix di nucleotidi ed RNA polimerasi. L'mRNA sintetico è stato poi formulato con nanoparticelle lipidiche e usato per proteggere miliardi di persone dal Covid-19. In questo consiste la transizione dai vaccini analogici ai vaccini sintetici.

From the entirabies vaccin to the mRNA vaccins

The first human vaccination of Louis Pasteur was with a rabies virus attenuated by exposure to dry air. He had developed a source of virulent virus by taking pieces of spinal cord from a rabid street dog and inoculating by trepanation under the *dura mater* (*dura*) into the cranium of a rabbit, and then passing it from rabbit to rabbit 20-25 times until the virus was consistently virulent. Then he took pieces of the spinal cord, each a few centimeters long, and exposed them to dry air and observed a gradual decreased virulence. On Monday, July 6, 1885, three people arrived from Alsace. One of them was Joseph Meister, a nine-year-old boy who had been bitten by a dog at 8:00am on July 4. The boy had at least 14 bites and his death from rabies seemed inevitable. On the evening of July 6, Pasteur inoculated the boy with material from a rabid rabbit spinal cord that had been dehydrated for 15 days. Joseph Meister survived the lethal infection and Pasteur concluded that the boy had not only survived the rabies from the bites of a rabid dog, but also direct inoculation of a more virulent virus. On January 10, 2020, the Chinese CDC loaded on the website the genomic sequence of SARS-CoV-2. The same day laboratories worldwide downloaded the sequence teleported by the internet and used computers to design a synthetic gene coding for the spike protein of the virus. The synthetic gene was then used to make fully synthetic mRNA using a mix of nucleotides and RNA polymerase. The synthetic mRNA was formulated with synthetic lipid nanoparticles and used to protect billions of people from Covid-19. This marked the transition from analog vaccines to digital vaccines.

LAURA ERCOLI¹, ELISA PELLEGRINO¹

I microbi come produttori di servizi per l'agro-ecosistema: biostimolanti e biofertilizzanti

¹ Crop Sciences Research Center, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

INTRODUZIONE

La gestione del biota del suolo è considerata una strategia chiave per mantenere e migliorare i servizi ecologici negli agroecosistemi (De Vries et al., 2013; Toju et al., 2018). I funghi micorrizici arbuscolari (AMF) supportano la crescita delle piante, la loro produttività e la fertilità del suolo (e.g., Smith and Read, 2008). L'evidenza dei benefici sulle colture a seguito dell'applicazione in campo dell'inoculo fungino suggerisce che le pratiche agricole intensive, come la lavorazione frequente e profonda, le elevate dosi di fertilizzanti azotati o fosforici, e la coltivazione intensiva hanno un impatto negativo sull'abbondanza degli AMF nel suolo (e.g., Lekberg and Koide, 2005; van der Heyde et al., 2017). Perciò, per ripristinare la naturale fertilità del suolo è utile e consigliabile applicare alla semina al terreno o al seme inoculi fungini che permettano l'incremento non solo della diversità degli organismi, ma anche della loro abbondanza e quindi del potenziale infettivo del suolo (Verbruggen et al., 2013).

Nell'Unione Europea, gli AMF sono catalogati come biostimolanti vegetali secondo il nuovo Regolamento (UE) 2019/1009, sulla base delle funzioni di stimolazione dei processi nutritivi delle piante, di tolleranza agli stress abiotici e di miglioramento della qualità del prodotto agricolo (UE, 2019). Per gli AMF, ma anche per altri microrganismi potenzialmente utilizzabili come biostimolanti, c'è un urgente necessità di chiarire meglio i meccanismi causali/funzionali e i loro potenziali effetti sull'ambiente (ad es., invasività e minaccia per la biodiversità del suolo e delle piante e funzionamento dell'ecosistema, Hart et al., 2017).

Oltre all'incremento della produzione delle colture (Lekberg and Koide, 2005; Pellegrino e Bedini, 2014; Pellegrino et al., 2015), l'inoculo in campo con AMF ha dimostrato di essere in grado di migliorare anche la qualità, attraverso l'aumento del contenuto di elementi minerali e di composti nutraceutici nelle produzioni (Lehmann et al., 2014; Lehmann and Rillig, 2015; Ercoli et al., 2017; Coccina et al., 2019; Pellegrino et al., 2020; Saleh et al., 2020).

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELL'APPLICAZIONE DELL'INOCULO IN CAMPO

Per determinare gli effetti dell'inoculazione con AMF e della colonizzazione delle radici da parte di AMF inoculati e non inoculati (popolazione nativa) sull'assorbimento di P, N e Zn, sulla crescita e sulla resa in granella del frumento abbiamo condotto una meta-analisi di 38 ricerche sperimentali in campo pubblicate utilizzando un data-set composto da 333 osservazioni (Pellegrino et al., 2015). L'inoculazione in campo con AMF ha aumentato la biomassa, la resa in granella, l'Harvest Index, la concentrazione e il contenuto di P della biomassa, il contenuto di P della paglia, la concentrazione e il contenuto di N della biomassa, il contenuto di N della granella e la concentrazione di Zn della granella. La produzione di granella era correlata positivamente con il tasso di colonizzazione radicale degli AMF, mentre la biomassa della paglia era correlata negativamente.

I più importanti fattori che determinano la risposta del frumento agli AMF erano la concentrazione di sostanza organica, il pH, l'N totale e il P disponibile e la tessitura del terreno, in aggiunta al clima e alla specie/isolato di AMF inoculato.

L'effetto dell'inoculazione in campo con AMF su due varietà di frumento duro è stato studiato in una ricerca in pieno campo in interazione con la dose di concime azotato e la sua modalità di frazionamento (Ercoli et al., 2017). La concimazione azotata ha incrementato la produzione di granella di entrambe le varietà, mentre nessun effetto statisticamente significativo è stato evidenziato per la modalità di frazionamento dell'N e l'inoculo con AMF. Di contro, in entrambe le varietà l'inoculo ha incrementato la concentrazione di N nella granella solo in corrispondenza del testimone non concimato, mentre ha incrementato la concentrazione di Fe e Zn nella granella con tutti i trattamenti di concimazione azotata (figg. 1 e 2).

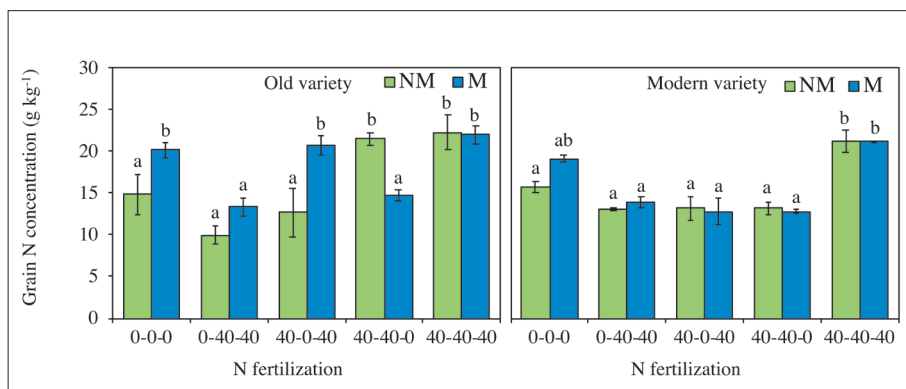


Fig. 1 Concentrazione di azoto (N) nella granella di due varietà di frumento duro: effetto dell'interazione tra modalità di frazionamento delle dose di N e inoculo con *Rhizophagus irregularis* (+M) in confronto con un controllo non inoculato (-M). I valori rappresentano la media \pm errore standard ($n=3$), lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($P \leq 0.05$) (Ercoli et al., 2017)

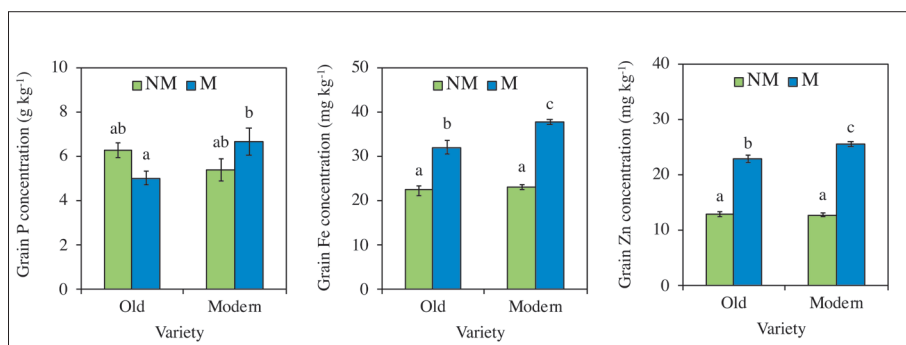


Fig. 2 Concentrazione di fosforo (P), ferro (Fe) e zinco (Zn) nella granella del frumento duro: effetto dell'interazione tra varietà e inoculo con *Rhizophagus irregularis* (+M) in confronto con un controllo non inoculato (-M). I valori rappresentano la media \pm errore standard ($n=15$), lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($P \leq 0.05$) (Ercoli et al., 2017)

Nella stessa ricerca, la presenza di AMF all'interno delle radici delle piante di frumento è stata determinata con metodi morfologici e molecolari durante il ciclo di sviluppo delle piante. In condizioni di bassa disponibilità di N, l'inoculazione con AMF ha provocato un maggiore e più precoce sviluppo del fungo all'interno delle radici, mentre ad alte disponibilità di N l'inoculo non ha modificato la colonizzazione radicale. In corrispondenza della maturazione

fisiologica, la colonizzazione radicale è risultata più ridotta con l'incremento della dose di N (fig. 3). Nelle piante non inoculate, l'abbondanza relativa di *Rhizophagus* MOTU Rh1PI era circa il 4% senza differenze significative tra le varietà, mentre in conseguenza dell'inoculazione, l'abbondanza relativa di Rh1PI, filogeneticamente affiliato alla specie inoculata (*Rhizophagus irregularis*), è aumentato al 50% e al 65% nelle radici della vecchia varietà Cappelli e della moderna varietà Svevo, rispettivamente (fig. 4). Tale incremento è risultato associato a una diminuzione di Fu1PI e Fu2PI, affiliati al genere *Funneliformis* (-68%, come media tra le varietà).

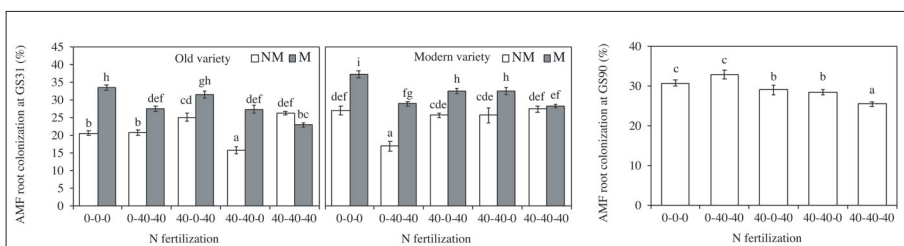


Fig. 3 Colonizzazione radicale AMF di due varietà di frumento duro alle fasi GS31 (primo nodo) e GS90 (maturazione fisiologica): effetto dell'interazione tra modalità di frazionamento della dose di N e inoculo con *Rhizophagus irregularis* (+M) in confronto con un controllo non inoculato (-M). I valori rappresentano la media \pm errore standard (n=3), lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($P \leq 0.05$) (Ercoli et al., 2017)

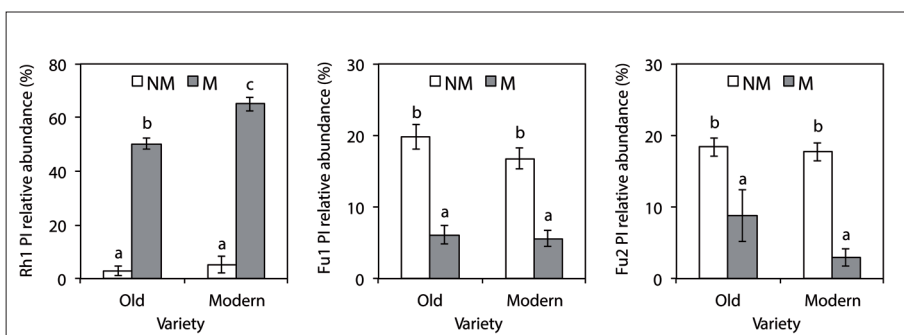


Fig. 4 Abbondanza relativa delle unità operazionali tassonomico-molecolari (MOTU) Rh1PI (a), Fu1PI (b) and Fu2PI (c) all'interno della comunità degli AMF nelle radici delle piante delle due varietà di frumento duro in relazione all'inoculo con *Rhizophagus irregularis* (+M) in confronto con un controllo non inoculato (-M). I valori rappresentano la media \pm errore standard (n=15), lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($P \leq 0.05$) (Ercoli et al., 2017)

In una ricerca successiva in pieno campo è stato studiato l'effetto dell'inoculazione con *Rhizophagus irregularis* in regime di agricoltura biologica su 11 vecchi genotipi e una moderna varietà di frumento tenero (Pellegrino et al., 2020). L'inoculazione ha aumentato la colonizzazione delle radici, la biomassa radicale e la concentrazione di Zn delle piante nella fase iniziale e la concentrazione di Fe della granella alla raccolta, mentre non ha modificato la produzione di granella (fig. 5). I genotipi variavano ampiamente per la concentrazione di Zn delle piante nella fase iniziale e per la resa in granella, lo Zn e la concentrazione di proteine in fase di maturazione fisiologica (fig. 6).

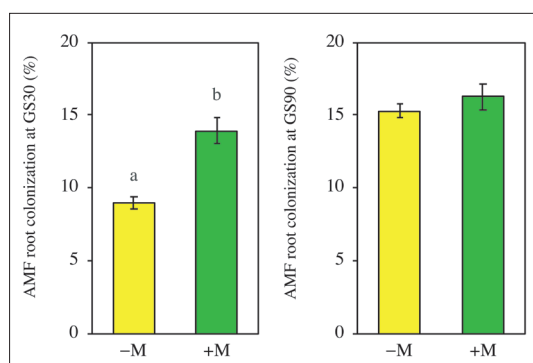


Fig. 5 Colonizzazione radicale di AMF del frumento alle fasi GS30 (inizio levata) e GS90 (maturazione fisiologica): effetto medio dell'inoculo con *Rhizophagus irregularis* (+M) in confronto con un controllo non inoculato (-M). I valori rappresentano la media \pm errore standard ($n=18$), lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($P \leq 0.05$) (Pellegrino et al., 2020)

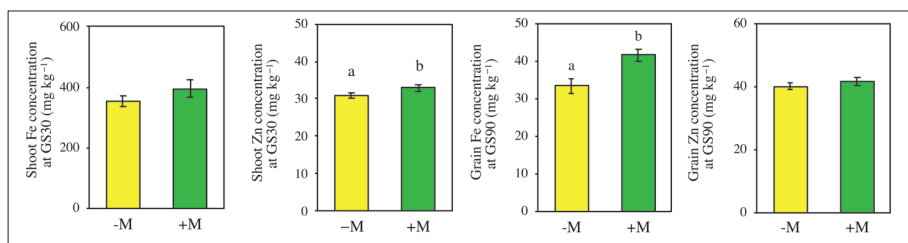


Fig. 6 Concentrazione di ferro (Fe) e zinco (Zn) nella biomassa del frumento in fase GS30 (inizio levata) e nella granella del frumento in fase GS90 (maturazione fisiologica): effetto medio dell'inoculo con *Rhizophagus irregularis* (+M) in confronto con un controllo non inoculato (-M). I valori rappresentano la media \pm errore standard ($n=18$), lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($P \leq 0.05$) (Pellegrino et al., 2020)

Per verificare l'ipotesi che più inoculanti di AMF siano in grado di agire in sinergia per promuovere la crescita dell'erba medica e la concentrazione di acidi grassi nel foraggio, è stato condotto un esperimento in pieno campo nel quale sono stati utilizzati come inoculanti singoli isolati di AMF esotici, una miscela degli stessi isolati e una miscela di AMF locali. Per due anni successivi e per due tagli in ciascun anno, sono state valutate le caratteristiche quantitative e qualitative della biomassa dell'erba medica.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come la produzione di foraggio accumulato (primi due tagli della coltura di uno e due anni di età) è aumentata del 68% in conseguenza dell'inoculazione, del 12% quando l'inoculante era composto da miscele fungine e del 20% quando la miscela era costituita da isolati esotici (fig. 7). Analogamente, il contenuto di acidi grassi nel foraggio accumulato per due anni e due tagli è aumentato del 105% in conseguenza dell'inoculazione, del 17% quando l'inoculante era composto da miscele fungine e del 20% quando la miscela era costituita da isolati esotici.

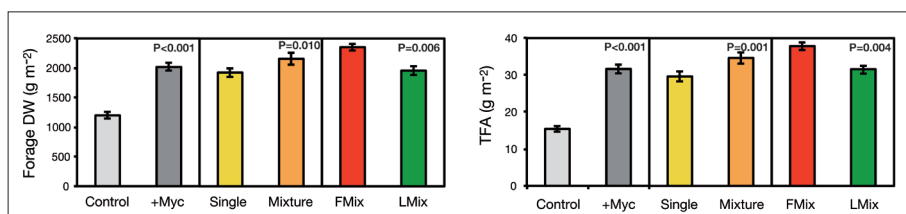


Fig. 7 Produzione di foraggio di erba medica e contenuto di acidi grassi nel foraggio accumulati per due anni e per due tagli in ciascun anno in relazione all'inoculo con AMF. Risultati dell'analisi dei contrasti ortogonali applicata per evidenziare le differenze tra le medie: inoculato (+ Myc) vs. controllo, isolati fungini singoli vs. miscele di inoculanti (Single vs. Mixture), e miscele di FMA esotici vs. locali (FMix vs. LMix) [Inoculanti: Funnelliformis mosseae BEG12, F. mosseae AZ225C, Rhizophagus irregularis BEG141, miscela FMA esotici-FMix (BEG12, AZ225C, e BEG141), miscela locale-LMix di 14 specie di FMA appartenenti a cinque famiglie, e controllo non inoculato. I valori rappresentano la media \pm errore standard ($n=3$) (Pellegrino et al., 2022)]

TRACCIAMENTO E PERSISTENZA DELL'INOCULANTE

L'efficacia degli inoculi a base di AMF dovrebbe essere confermata da evidenze del loro insediamento e persistenza in campo. I tentativi di tracciare direttamente gli inoculanti in campo sono pochi a causa del fatto che i metodi morfologici (es. colorazione e conteggio al microscopio) sono di complessa applicazione perché molte specie di AMF che colonizzano la stessa radice sono morfologi-

camente indistinguibili, mentre gli attuali marcatori molecolari possono difficilmente distinguere tra taxa strettamente correlati e il rilevamento di isolati di specie fungine specifiche rimane impegnativo in campo (Hart et al., 2015).

Nella ricerca di Pellegrino et al. (2020), utilizzando marcatori molecolari a basso livello di risoluzione che permettono di classificare gli AMF presenti a livello di genere, è stato evidenziato che l'inoculazione in campo ha modificato in maniera differenziale la comunità di AMF all'interno delle radici di frumento dei genotipi Autonomia B, Frassineto e Bologna. Tuttavia, una maggiore abbondanza di *Rhizophagus* sp., presumibilmente corrispondente all'isolato inoculato, è stata dimostrata solo nel genotipo Frassineto (fig. 8). Questi risultati dimostrano che esiste una forte differenza di compatibilità tra inoculante e genotipo della coltura.

La colonizzazione radicale di AMF nell'apparato radicale di erba medica è stata valutata in conseguenza dell'inoculo con isolati singoli, multipli, nativi ed esotici, attraverso la determinazione morfologica delle strutture fungine al microscopio (Pellegrino et al., 2022). La colonizzazione radicale è aumentata nel tempo e con lo sviluppo della coltura, dal primo anno al secondo, ma il tasso di incremento è risultato diverso tra gli inoculanti (fig. 9). Un mese dopo la semina, la colonizzazione radicale era superiore con tutti gli inoculanti (da +22% con BEG141% a +34% con Fmix) sebbene le differenze non fossero statisticamente significative. Analogamente, all'inizio della ricrescita primaverile del primo anno, l'inoculazione ha provocato un incremento della colonizzazione radicale, mentre nel secondo anno non sono stati registrati ulteriori incrementi. In questa fase, le differenze di colonizzazione tra inoculanti erano modeste (36-41%) e statisticamente non significative.

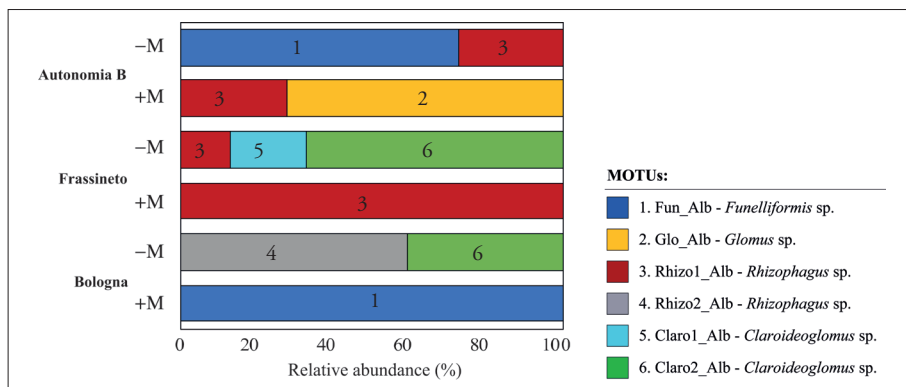


Fig. 8 *Abbondanza relativa delle unità operative tassonomico-molecolari (MOTU) di AMF nelle radici dei genotipi delle varietà di frumento tenero Autonomia B, Frassineto e Bologna (Pellegrino et al., 2020)*

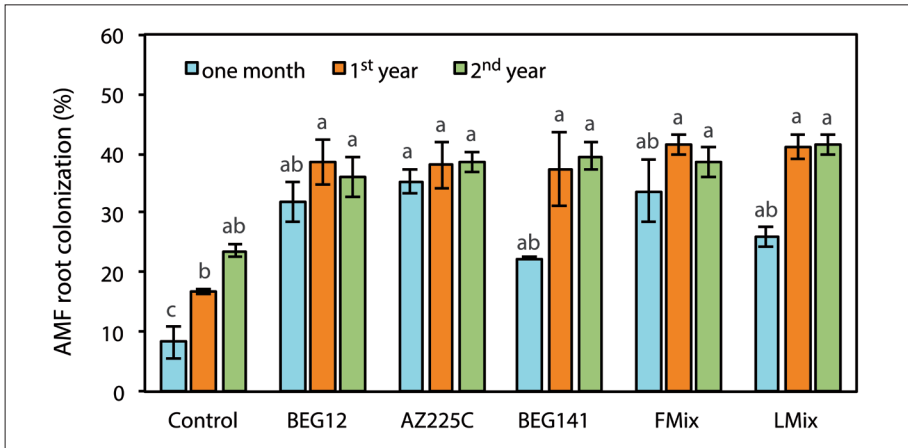


Fig. 9 Colonizzazione radicale di AMF di erba medica (*Medicago sativa* L.): interazione inoculo fungino [*Funnelliformis mosseae* BEG12, *F. mosseae* AZ225C, *Rhizophagus irregularis* BEG141, miscela esotica (FMix) (BEG12, AZ225C, e BEG141), miscela locale (LMix) di 14 specie di funghi AM appartenenti a cinque famiglie, e controllo non inoculato] e stadio di crescita della coltura (1 mese dalla semina, coltura di un anno e coltura di due anni di età) (Pellegrino et al., 2022)

Nella stessa ricerca, è stata studiata la persistenza degli inoculanti di AMF applicati all'erba medica utilizzando sonde molecolari ad alto livello di risoluzione, che permettevano di discriminare l'isolato inoculato dagli AMF nativi. *Funnelliformis mosseae* AZ225C è risultato il più persistente sia come inoculo singolo che in miscela, seguito da *F. mosseae* BEG12 e *R. irregularis* BEG141 (tab. 1). Nelle parcelle inoculate con BEG12 e AZ225C oltre il 60% delle sequenze trovate sono state assegnate a *F. mosseae* esotico o locale, mentre nelle parcelle trattate con BEG141, *F. mosseae* rappresentava solo il 7.4% delle sequenze. Facendo il confronto tra il controllo e la miscela locale di 7 specie di AMF (LMix), il *F. mosseae* locale e gli altri taxa Glomeromycota rappresentavano il 44% e 37% delle sequenze totali nel controllo, mentre rappresentavano il 39 e 45%, rispettivamente, nelle parcelle LMix. Infine i clusters 1-9 di *R. irregularis* locale hanno formato un unico gruppo in tutti i trattamenti, sebbene i clusters 5 e 6 fossero più abbondanti nelle parcelle del controllo, BEG12 e BEG141.

FILOTIPI	ABBONDANZA RELATIVA NELLE RADICI (%)					
	Controllo	BEG12	AZ225C	BEG141	FMix	LMix
BEG12	-	34.7			5.4	-
AZ225C	-	-	45.1	-	13.0	-
BEG141	-	-	-	16.4	2.7	-
<i>F. mosseae</i> locale	44.0** e	25.6 cd	20.9 bc	7.4 a	18.4 b	29.5 d
<i>R. irregularis</i> cluster 1 locale	0.0 a	2.2 ab	2.6 ab	1.9 ab	4.3 b	2.9 ab
<i>R. irregularis</i> cluster 2 locale	1.7 a	2.3 a	4.3 a	1.3 a	2.7 a	3.9 a
<i>R. irregularis</i> cluster 3 locale	1.1 a	2.8 a	1.3 a	1.7 a	5.4 a	3.9 a
<i>R. irregularis</i> cluster 4 locale	0.0 a	3.4 b	2.2 ab	3.9 b	2.7 ab	2.9 ab
<i>R. irregularis</i> cluster 5 locale	6.9 a	3.4 a	3.9 a	4.2 a	2.2 a	2.9 a
<i>R. irregularis</i> cluster 6 locale	6.4 b	5.8 b	3.1 ab	1.9 a	2.1 a	1.9 a
<i>R. irregularis</i> cluster 7 locale	1.3 a	2.3 a	3.5 a	1.7 a	2.7 a	2.4 a
<i>R. irregularis</i> cluster 8 locale	1.6 a	3.4 a	2.6 a	3.4 a	2.2 a	1.9 a
<i>R. irregularis</i> cluster 9 locale	0.0 a	3.4 a	2.6 a	1.3 a	2.1 a	2.9 a
Altre	37.0 b	10.7 a	7.9 a	54.9 d	34.1 b	44.9 c

Tab. 1 *Abbondanza relativa dei filotipi di AMF appartenenti alle specie Funneliformis mosseae e Rhizophagus irregularis nelle radici di erba medica di due anni all'inizio della ricrescita primaverile inoculate al suolo alla semina con F. mosseae BEG12, F. mosseae AZ225C, R. irregularis BEG14, miscela esotica-FMix foreign (BEG12, AZ225C, and BEG141), miscela locale-LMix di sette specie di AMF e controllo non inoculato. Altre specie/ taxa appartenenti al phylum Glomeromycotina sono indicate come altre*

RIASSUNTO

La gestione del biota del suolo è considerata una strategia chiave per mantenere e migliorare i servizi ecologici negli agroecosistemi. I funghi simbionti micorrizici arbuscolari (AMF) supportano la crescita delle piante, la loro produttività e la fertilità del suolo. Tuttavia, l'evidenza dei benefici sulle colture a seguito dell'applicazione in campo dell'inoculo fungino suggerisce che le pratiche agricole intensive, come la lavorazione frequente e profonda, le elevate dosi di fertilizzanti azotati o fosforici, e la coltivazione intensiva hanno un impatto negativo sull'abbondanza di AMF nel suolo. Nonostante l'enorme interesse commerciale per gli inoculanti microbici (biostimolanti e biofertilizzanti), associati a un crescente mole di ricerca, i dettagliati meccanismi molecolari, cellulari e fisiologici alla base delle interazioni pianta-biostimolante in diversi ambienti e strategie di gestione rimangono in gran parte sconosciuti. Questa presentazione esamina gli attuali contributi degli inoculanti AMF alle colture in pieno campo per l'aumento della produzione e il miglioramento dei caratteri di qualità e identifica i consorzi microbici con il maggiore potenziale per supportare i servizi ecosistemici.

ABSTRACT

Microbial inoculants as service provider for the agro-ecosystem: biostimulants and biofertilizers. The management of soil biota is considered a key strategy to maintain and improve ecological services in agro-ecosystems. The plant symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) support plant growth, productivity, and soil fertility. However, the evidence of crop benefits following field application of fungal inoculum suggests that intensive agricultural practices, such as frequent and deep tillage, high P or N fertilizer rate, and continuous cropping, have a negative impact on AMF abundance in soil. Despite the huge commercial interest in microbial inoculants (biostimulants and biofertilizers), associated with a growing body of research, the detailed molecular, cellular, and physiological mechanisms underlying plant-biostimulant interactions under different environments and management strategies remain largely unknown. This presentation examines the current contributions of AMF inoculants to field crops to the increase of production and improvement of quality characters and identifies microbial consortia with the greatest potential for supporting ecosystem services.

BIBLIOGRAFIA

- COCCINA A., CAVAGNARO T.R., PELLEGRINO E., ERCOLI L., McLAUGHLIN M.J., WATTS-WILLIAMS S. J. (2019): *The mycorrhizal pathway of zinc uptake contributes to zinc accumulation in barley and wheat grain*, «BMC Plant Biology», 19, p. 133.
- DE VRIES F.T., THÉBAULT E., LIIRI M., BIRKHOFFER K., TSIAFOULI M.A., BJØRNLUND L. et al. (2013): *Soil food web properties explain ecosystem services across European land use systems*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 110, 14296-14301.
- ERCOLI L., SCHÜSSLER A., ARDUINI I., PELLEGRINO E. (2017): *Strong increase of durum wheat iron and zinc content by field-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi at different soil nitrogen availabilities*, «Plant and Soil», 419, pp. 153-167.
- EU (2019): E.U. Regulation of the European Parliament and of the Council Laying Down Rules on the Making Available on the Market of EU Fertilising Products and Amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and Repealing Regulation (EC) No 2003/2003. 2019. Available online at: <https://eurlex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2019:170:TOC> (accessed on 1 March 2022).
- HART M.M., ALEKLETT K., CHAGNON P.L., EGAN C., GHIGNONE S., HELGASON T. (2015): *Navigating the labyrinth: a guide to sequence-based, community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi*, «New Phytologist», 207, pp. 235-247.
- HART M.M., ANTUNES P.M., CHAUDHARY V.B., ABBOTT L.K. (2017): *Fungal inoculants in the field: is the reward greater than the risk?*, «Functional Ecology», 32, pp. 126-135.
- LEHMANN A., RILLIG M.C. (2015): *Arbuscular mycorrhizal contribution to copper, manganese and iron nutrient concentrations in crops. A meta-analysis*, «Soil Biology and Biochemistry», 81, pp. 147-158.
- LEHMANN A., VERESOGLOU S.D., LEIFHEIT E.F., RILLIG M.C. (2014): *Arbuscular mycorrhizal influence on zinc nutrition in crop plants—a meta-analysis*, «Soil Biology and Biochemistry», 69, pp. 123-131.
- LEKBERG Y., KOIDE R.T. (2005): *Is plant performance limited by abundance of arbuscular*

- mycorrhizal fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003*, «New Phytol.», 168, pp. 189-204.
- PELLEGRINO E., BEDINI S. (2014): *Enhancing ecosystem services in sustainable agriculture: biofertilization and biofortification of chickpea (Cicer arietinum L.) by arbuscular mycorrhizal fungi*, «Soil Biology and Biochemistry», 68, pp. 429-439.
- PELLEGRINO E., ÖPIK M., BONARI E., ERCOLI L. (2015): *Responses of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi: a meta-analysis of field studies from 1975 to 2013*, «Soil Biology and Biochemistry», 84, pp. 210-217.
- PELLEGRINO E., PIAZZA G., ARDUINI I., ERCOLI L. (2020): *Field inoculation of bread wheat with Rhizophagus irregularis under organic farming: variability in growth response and nutritional uptake of eleven old genotypes and a modern variety*, «Agronomy», 10, pp. 333.
- PELLEGRINO E., NUTI M., ERCOLI L. (2022): *Multiple arbuscular mycorrhizal fungal consortia enhance yield and fatty acids of Medicago sativa: A two-year field study on agronomic traits and tracing of fungal persistence*, «Frontiers in Plant Science», pp. 13.
- SALEH A.M., ABDEL-MAWGOUD M., HASSAN A.R., HABEEB T.H., YEHIA R.S., ABDEL-GAWAD H. (2020): *Global metabolic changes induced by arbuscular mycorrhizal fungi in oregano plants grown under ambient and elevated levels of atmospheric CO₂*, «Plant Physiology and Biochemistry», 151, pp. 255-263.
- SMITH S.E., READ D.J. (2008): *Mycorrhizal Symbiosis*, Amsterdam, Academic Press.
- TOJU H., PEAY K.G., YAMAMICHI M., NARISAWA K., HIRUMA K., NAITO K. et al. (2018): *Core microbiomes for sustainable agroecosystems*, «Nature Plants», 4, pp. 247-257.
- VAN DER HEYDE M., OHSOWSKI B., ABBOTT L. K., HART M. (2017): *Arbuscular mycorrhizal fungus responses to disturbance are context-dependent*, «Mycorrhiza», 27, pp. 431-40.
- VERBRUGGEN E., VAN DER HEIJDEN M.G., RILLIG M.C., KIERS E.T. (2013): *Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success*, «New Phytologist», 197, pp. 1104-1109.

ALESSIO GIACOMINI¹, CHIARA NADAI¹, VIVIANA CORICH¹

Aspettative e limitazioni nell'uso dei fermenti lattici probiotici

¹ Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente (DAFNAE),
Università degli Studi di Padova

INTRODUZIONE

Il termine probiotico nasce dall'unione della parola latina pro- ("a favore di") e dell'aggettivo greco βιωτικός (biotico), proveniente dal sostantivo βίος (bios, "vita"). Si tratta quindi, in linea generale, di sostanze in grado di apportare dei benefici all'organismo umano. In particolare, nel caso dei probiotici, si fa riferimento a organismi viventi e più specificatamente a microrganismi. Il primo studioso a occuparsi di questo tema fu Ill'ja Il'ič Mečnikov (1845-1916), uno studioso russo, di 23 anni più giovane di Pasteur. Mečnikov fu uno dei padri della moderna immunologia, grazie ai suoi studi sul meccanismo della fagocitosi, che gli fruttarono il premio Nobel per la medicina nel 1908. Agli inizi del '900, Mečnikov sviluppò il concetto di probiotico, studiando alcune popolazioni del Caucaso che erano solite consumare grandi quantità di latte fermentato. Mečnikov ipotizzò che questi batteri e l'acido da loro prodotto durante lo sviluppo nel latte, potessero in qualche modo favorire il benessere dell'intestino umano, dato che l'età media di queste popolazioni era superiore a quella di popoli di regioni limitrofe. Sull'onda di questi primi studi, già negli anni '30 Minoru Shirota sviluppò in Giappone un preparato a base di latte scremato fermentato che chiamò Yakult, un prodotto tuttora presente sul mercato, contenente lo stesso ceppo batterico, il *Lactobacillus casei* Shirota, con cui fu inizialmente prodotto. Anche se il termine probiotico fu ufficialmente accettato nel 1965 (Lilly e Stilwell, 1965), nel corso degli anni si sono succedute parecchie definizioni per descrivere questo concetto (tab. 1).

YEAR	DEFINITION
1953	Probiotics are common in vegetable food as vitamins, aromatic substances, enzymes and possibly other substances connected with vital processes
1954	Probiotics are opposite of antibiotic
1955	Deleterious effects of antibiotics can be prevented by probiotic therapy
1974	Organisms and substances that contribute to intestinal microbial balance
1992	Live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving microbial balance
1992	Viable mono- or mixed culture of live microorganisms which, applied to animals or man, have a beneficial effect on the host by improving the properties of the indigenous microflora
1996	Living microorganisms which, upon ingestion in certain numbers, exert health benefits beyond inherent basic nutrition
1999	Microbial cell preparations or components of microbial cells that have a beneficial effect on the health and well-being of the host
2002	Live microorganisms that when administered in adequate amount confer a health benefit on the host (FAO/WHO)

Tab. 1 *Lista delle principali definizioni (in lingua inglese) di probiotico succedutesi negli anni*

La definizione attualmente utilizzata si deve alla FAO e all'Organizzazione Mondiale della Sanità (FAO/WHO, 2002), e definisce i probiotici come «microorganismi vivi che, somministrati in adeguate quantità, conferiscono all'ospite un beneficio in termini di salute». Lo stesso documento definisce anche alcune caratteristiche che un microorganismo probiotico dovrebbe possedere:

- a. deve essere stato anzitutto tassonomicamente definito, cioè si deve conoscere la specie a cui appartiene. I principali probiotici sono batteri, ma anche altri microorganismi, per esempio il lievito *Saccharomyces boulardii*, sono attualmente disponibili sul mercato;
- b. deve essere vivo quando viene ingerito, anche se non necessariamente vitale. Questo significa che i probiotici possono anche essere somministrati in forme quiescenti (ad esempio endospore), come avviene per uno dei probiotici maggiormente commercializzati in Italia, che contiene un unico ceppo della specie *Bacillus clausii* sotto forma di endospora;
- c. deve essere stato sottoposto a una valutazione per documentare i benefici per la salute dell'ospite, cioè nei confronti dell'organismo umano. Questa proprietà deve essere dimostrata da adeguati studi scientifici;
- d. la sua ingestione non deve creare problemi all'organismo umano.

FONTI DI PROBIOTICI

I microrganismi probiotici sono concepiti per svolgere funzioni benefiche all'interno dell'intestino umano, quindi l'ambiente più indicato dal quale isolare nuovi potenziali ceppi probiotici è proprio quello dove loro si trovano naturalmente e lavorano, cioè l'intestino umano. Per questa ragione, la maggior parte dei batteri probiotici sono stati isolati dal contenuto intestinale, attraverso il campionamento di feci, sia di adulti che di bambini, in particolare lat-tanti (Hyemin et al., 2021). Altra fonte importante di probiotici è costituita dal latte umano, che ha dimostrato di contenere interessanti ceppi microbici, in particolare appartenenti al genere *Bifidobacterium*. Ulteriore luogo per la ricerca di probiotici sono i prodotti lattiero-caseari fermentati, quali yogurt e vari tipi di lattici fermentati e formaggi stagionati. In tempi più recenti, la ricerca si è rivolta anche verso fonti meno tradizionali, quali prodotti fermentati non a base di latte, come frutta, verdura o carni, o dal suolo, oppure dall'apparato digerente di animali, inclusi i pesci.

REQUISITI DI SICUREZZA

È legittimo chiedersi se qualsiasi microrganismo che abbia dimostrato interessanti proprietà possa essere utilizzato come probiotico. La risposta è chiaramente negativa, perché al di là degli effetti benefici, requisito essenziale per un probiotico è di non arrecare danno, con la sua presenza e/o attività, al consumatore che lo ingerisce. Per chiarire questo aspetto l'Unione Europea, attraverso l'EFSA (*European Food Safety Authority*), ha sviluppato il concetto di QPS (*Qualitative Presumption of Safety*, presunzione qualificata di sicurezza) che si rifa al concetto di GRAS (*Generally Recognized As Safe*) adottato negli Stati Uniti, in base a cui, per essere proposto come probiotico, un microrganismo deve appartenere ad una specie che possieda lo status di QPS. Lo schema operativo per definire tale status è illustrato in figura 1.

Anzitutto il microrganismo deve essere chiaramente identificato a livello di specie (oggi l'approccio preferibile è l'identificazione genetica, tramite la sequenza del 16S rDNA o ancor meglio attraverso la sequenza dell'intero genoma, ormai possibile a costi contenuti). Una volta identificato il microrganismo, bisogna verificare se ci sia una sufficiente quantità di conoscenze sugli aspetti riguardanti la sicurezza per quella specie, definiti come *Sufficient Body of Knowledge*. Si tratta anzitutto di conoscere la storia di utilizzo del microrganismo, per esempio se la specie sia utilizzata da lungo tempo per uso alimentare umano. Ci sono microrganismi che vengono regolarmente ingeriti da millenni

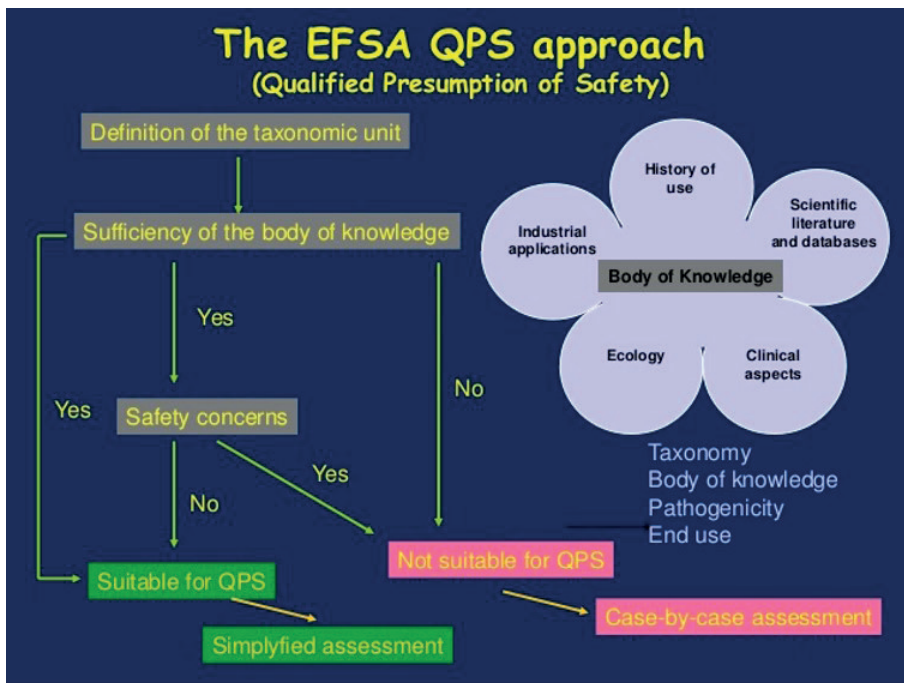


Fig. 1 Diagramma di flusso per l'attribuzione dello status di QPS

(anche se inconsapevolmente, visto che conosciamo l'esistenza dei microbi solo da poco più di cent'anni, grazie agli studi di Pasteur) senza aver creato problemi, come ad esempio i batteri lattici presenti nei lattici fermentati e nei formaggi. Poi deve essere verificato che la letteratura scientifica non riporti presenza di problemi, in particolare in ambito clinico, e se sono già in uso delle applicazioni industriali per microrganismi di quella specie. Tutte queste formazioni costituiscono il "corpo di conoscenza", che viene analizzato per conferire lo status QPS (la lista aggiornata delle specie QPS è consultabile al link <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps>). Qualora la specie non abbia lo status di QPS, il microrganismo dovrà essere sperimentalmente sottoposto a tutti i test per verificarne la sicurezza, *in vitro* prima e poi *in vivo*.

I BATTERI LATTICI

La categoria microbica che attualmente contiene la quasi totalità dei batteri probiotici disponibili sul mercato, è quella dei batteri lattici. Si tratta di un

gruppo abbastanza eterogeneo di batteri che possiedono alcune caratteristiche comuni: sono Gram positivi, non sono in grado di formare endospore, sono microrganismi anaerobi, che non utilizzano ossigeno per il loro sviluppo. Il termine “lattici”, non fa riferimento al latte, anche se molti di essi sono presenti in questo alimento, ma è legato alla caratteristica, comune a tutti questi batteri, di produrre acido lattico attraverso la fermentazione degli zuccheri, in particolare del glucosio. Oltre che nel latte possono essere trovati infatti nell’intestino umano e degli animali, sui vegetali e su vari materiali organici in decomposizione. Da qui possono essere trasportati e quindi ritrovati nelle acque, nel suolo e sulle superfici dei vegetali. Batteri lattici possono anche essere isolati da alimenti fermentati quali formaggi, latti fermentati, carni e bevande. La tabella 2 riporta un elenco dei principali generi di batteri lattici di interesse alimentare, a cui appartengono molti dei probiotici attualmente noti.

Tests	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leuconostocs</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
Cell morphology	Cocci/round	Rods	Cocci/ovoid	Cocci/chain	Cocci/round	Cocci/round
Gram test	+	+	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-	-	-
Catalase test	-	-	-	-	-	-
CO ₂ from glucose	+	+	+	-	+	-
Fermentation of carbohydrate						
Glucose	-	+	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	±	±	±	±	+
Sucrose	+	+	±	±	-	+
Melibiose	±	±	-	-	-	-
Raffinose	+	-	-	-	-	±
Sorbitol	-	+	±	-	-	±
Growth at (T°)						
10 °C	-	-	-	-	±	-
15 °C	+	+	+	-	+	+
45 °C	±	±	-	±	±	±
Growth at (%NaCl)						
2%	+	-	+	+	±	+
4%	+	±	-	+	+	+
6.5%	±	-	-	-	-	-

+= Positive, -= negative, ±= varies between isolates

Tab. 2 *Principali generi di batteri lattici di interesse alimentare e alcuni caratteri distintivi rilevanti (Wassie e Wassie, 2016)*

PRINCIPALI CARATTERISTICHE DEI PROBIOTICI

La prima caratteristica che deve essere posseduta da un probiotico è la capacità di resistere allo stress dovuto al transito attraverso il tratto gastrointestinale umano. Proprio per proteggersi da microrganismi potenzialmente dannosi, in-

fatti, l'apparato gastrointestinale è dotato di numerose difese naturali, a partire dagli enzimi presenti nella saliva, alla forte acidità dello stomaco, alla presenza dei sali biliari e di microrganismi competitivi stabilmente residenti nell'intestino. Per poter raggiungere l'intestino, il probiotico deve quindi essere in grado di sopravvivere in numero sufficiente al transito intestinale. Questa proprietà viene normalmente valutata *in vitro*, simulando artificialmente l'ambiente dello stomaco e dell'intestino. La figura 2 mostra i risultati relativi alla perdita di vitalità di 10 ceppi probiotici a seguito dell'incubazione di un'ora in succo gastrico, seguita da 3 o 5 ore in succo enterico. Si osserva che i microrganismi hanno buona capacità di resistenza, in quanto la perdita di vitalità risulta contenuta, al di sotto di 1,5 logaritmi. I primi nove ceppi sono dei nuovi isolati, mentre l'ultimo è il noto *Lactobacillus rhamnosus* GG, da tempo presente in commercio, che evidenzia una perdita di vitalità notevolmente maggiore, specie per incubazioni prolungate. Questo risultato suggerisce come ci sia ancora molto spazio per ricercare nuovi microrganismi probiotici, dotati di migliori caratteristiche rispetto a quelli che si trovano attualmente in commercio.

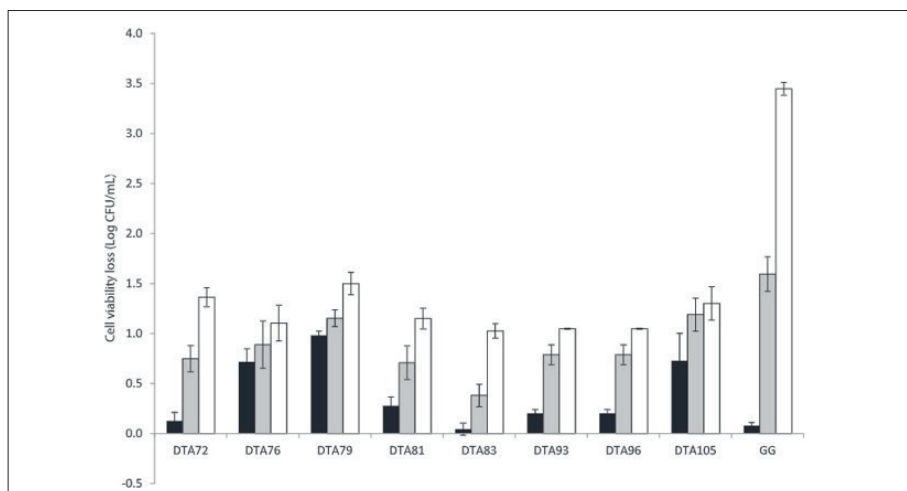


Fig. 2. Perdita di vitalità di ceppi di *Lactobacillus* sottoposti a transito in condizioni gastrointestinali simulate. Nero: dopo un'ora di incubazione in succo gastrico; grigio: dopo un'ulteriore incubazione di 3 ore in succo intestinale; bianco: dopo ulteriori 2 (totale 5) ore di incubazione in succo intestinale (Tarrach et al., 2019)

Successivamente a questa fondamentale proprietà devono essere testate le potenzialità probiotiche del ceppo. La tabella 3 elenca alcune delle principali caratteristiche che vengono ricercate nei potenziali batteri probiotici.

- Resistenza alle condizioni del tratto gastrointestinale
- Test di sensibilità agli antibiotici (assenza di antibiotico-resistenza trasmissibile, ...)
- Attività benefiche (es: riduzione del colesterolo, produzione di GABA, ...)
- Produzione di sostanze benefiche (es: folati, vitamine)
- Attività antimicrobica contro batteri patogeni
- Adesione a cellule tumorali
- Attività citotossica contro cellule tumorali
- Assenza di citotossicità verso cellule umane
- ...

Tab. 3 *Elenco delle principali attività riscontrabili nei microrganismi probiotici*

Tra queste spicca la necessità di verificare l'assenza di geni per antibiotico-resistenza che siano trasmissibili (cioè collocati su molecole di DNA mobili, come plasmidi o trasposoni). Tra le attività maggiormente studiate nei probiotici, molto interessante risulta la capacità di bloccare lo sviluppo di cellule tumorali, valutando la capacità di adesione e la capacità citotossica, parallelamente all'assenza di tossicità verso le cellule umane sane. Questi test vengono condotti in vitro mediante l'uso di colture cellulari, ma su questo tema si ritrova in letteratura anche un crescente numero di studi su animali (Duarte et al., 2020).

Per ovviare alla debolezza di un ceppo nei confronti del transito gastrointestinale, si può ricorrere ad approcci tecnologici, tra cui l'incapsulazione dei microrganismi all'interno di matrici inerti. La figura 3 mostra l'incremento di vitalità a seguito dell'uso di diversi materiali. A partire da sodio alginato, un materiale da tempo usato per questo scopo, si è aggiunta inulina (un polimero del fruttosio presente in molti vegetali), oppure gelatina, oppure fucosil-lat-tato, un'oligosaccaride presente nel latte umano. Come si vede dal grafico, rispetto al ceppo TH982 non protetto, i vari metodi di incapsulazione consentono un incremento di vitalità quando sottoposti a transito gastrointestinale simulato, che nel caso di S+I e di S+F raggiunge valori decisamente rilevanti.

EFFICACIA DEI PROBIOTICI

La domanda fondamentale riguardo i ceppi probiotici è se questi attuino nell'ambiente intestinale le attività che dimostrano in laboratorio. La risposta non è facile. Anche se tutte le proprietà probiotiche vengono accuratamente testate, scientificamente misurate e i risultati pubblicati su riviste scientifiche specializzate, il problema nasce dal fatto che in laboratorio la valutazione viene fatta in maniera molto mirata, studiando un determinato microrganismo per una specifica funzione. Ad esempio, la capacità di contrastare un batterio patogeno viene verificata

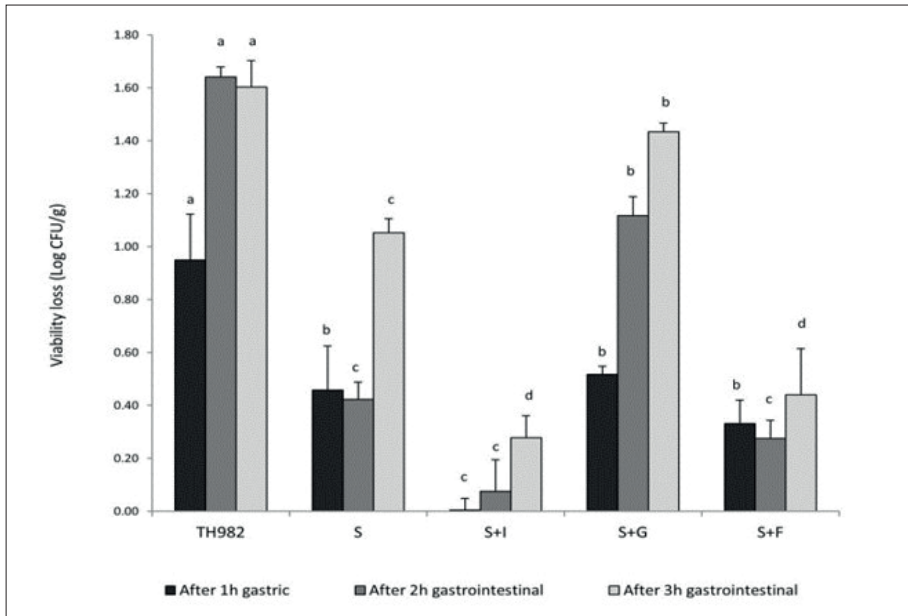


Fig. 3 Livelli di sopravvivenza di cellule del batterio probiotico *Streptococcus thermophilus* TH982 durante l'esposizione a condizioni simulate di transito gastrointestinale, incapsulato con diversi materiali: S: sodio alginato; S+I: sodio alginato + inulina; S+G: sodio alginato + gelatina; S+F: sodio alginato + fucosil-lattato (Pakroo et al., 2021)

coltivando assieme probiotico e patogeno e misurando gli effetti in termini di mortalità del patogeno. Oppure, la capacità di degradare il colesterolo viene valutata in un substrato nel quale viene aggiunto del colesterolo e misurando la quantità che il microorganismo riesce a eliminare. Quando si passa all'interno dell'intestino umano, il quadro si arricchisce di un numero incredibilmente elevato di altri fattori, che costituiscono altrettante variabili da valutare scientificamente. In particolare, queste sono legate alla genetica di ciascun individuo e alla composizione di quella che una volta veniva denominata la flora intestinale, che oggi viene definita microbiota. Attualmente è noto che il numero di microrganismi, prevalentemente batteri, che abitano sulla superficie e all'interno del corpo di una persona sana è di circa 30.000 miliardi, pari circa al numero di cellule umane che costituiscono il corpo stesso. La maggior parte di queste cellule batteriche si trova nel microbiota intestinale, che risulta enormemente diverso da individuo a individuo. Arrivare quindi a definire nel dettaglio le interazioni possibili tra il probiotico e l'enorme biodiversità presente nell'intestino di ogni persona è operazione praticamente irrealizzabile. Per tale ragione risulta molto difficile oggi de-

terminare scientificamente un rapporto di causa effetto *in vivo* di quello che invece è chiaramente determinabile *in vitro* (Scourboutakos et al., 2017). Quindi, non potendo avere dei dati scientifici, in Italia la legge non consente di scrivere sulle confezioni di probiotici indicazioni specifiche quali “abbassa il colesterolo” o “uccide il patogeno XYZ”. È possibile indicare genericamente che “Favorisce l’equilibrio della flora intestinale”. Ciò non significa che il microbo non svolga quella determinata azione, ma siccome non si può quantificarne l’effettiva entità nel complicatissimo habitat intestinale, si può solo esprimere un giudizio di tipo qualitativo, quale quello di favorire l’equilibrio della flora intestinale.

NON SOLO PROBIOTICI

Accanto ai probiotici, da circa trent’anni si è andata sviluppando anche la categoria dei prebiotici. Anche se i nomi sono molto simili, si tratta in realtà di concetti molto diversi. I prebiotici, infatti, a differenza dei probiotici, non sono organismi viventi, ma fibre, e più precisamente polisaccaridi che hanno la caratteristica di non essere digeribili dall’organismo umano. Queste molecole attraversano infatti l’intestino tenue e arrivano nel colon, dove sono invece selettivamente utilizzate da alcune specie batteriche che risiedono stabilmente in questa parte dell’apparato digerente. I prebiotici vengono preferibilmente utilizzati da batteri benefici e in particolare dai bifidobatteri. L’ingestione di prebiotici ha infatti dimostrato di essere in grado di incrementare lo sviluppo di questa categoria di batteri nell’ultima parte dell’intestino. Nella tabella 4 è riportata una lista dei principali alimenti contenenti molecole prebiotiche.

ALIMENTO	PRINCIPALE PREBIOTICO PRESENTE
Radice di cicoria	Inulina (polimero del fruttosio)
Topinambur	Inulina
Aglio	Frutto-oligosaccaridi (FOS)
Cipolle	Frutto-oligosaccaridi (FOS)
Asparagi	Inulina
Banane	Inulina, amido resistente
Orzo	Beta-glucani
Avena	Beta-glucani, amido resistente
Semi di lino	Fibre solubili mucillaginose
Carciofi	Inulina
Crusca di frumento	Arabino-xilani oligosaccaridi (AXOS)

Tab. 4 *Alcuni tra i principali alimenti contenenti prebiotici e tipologia di molecole maggiormente presente*

Un prodotto che contenga probiotici e prebiotici viene definito sinbiotico, evidenziando la sinergia che si genera tra il microbo e la fibra (sarebbe errato invece denominarlo simbiotico, termine che descrive una relazione tra due esseri viventi). Un sinbiotico non è dato dal semplice mescolamento di un batterio probiotico con una fibra indigeribile, ma deve essere dimostrato che la molecola prebiotica favorisce lo sviluppo di quello specifico probiotico all'interno dell'intestino (Penka e Kaloyan, 2017).

Ulteriori più recenti sviluppi delle ricerche hanno portato alla definizione dei postbiotici. Si tratta di prodotti che contengono microrganismi probiotici che sono stati però inattivati. Questi prodotti possono essere costituiti dalle cellule del probiotico inattivate, o dalle cellule morte unitamente alle molecole che queste hanno prodotto durante il loro sviluppo. L'uccisione delle cellule rende il prodotto più stabile durante la conservazione (può essere mantenuto a temperatura ambiente anziché refrigerato), ma le cellule anche se morte conservano alcune importanti proprietà, tra le quali la stimolazione della risposta immunitaria ed effetti sulla permeabilità dell'epitelio intestinale. Un postbiotico recentemente immesso in commercio è costituito da cellule pastorizzate di *Akkermansia muciniphila*, uno dei batteri più studiati del microbiota intestinale, la cui presenza si è dimostrata maggiore in persone in buono stato di salute.

Gli studi più recenti sui microrganismi potenzialmente benefici per l'organismo umano stanno portando alla luce relazioni impensabili fino a pochi anni fa. Un esempio tra i più eclatanti è il *Gut-Brain axis*, l'asse intestino-cervello, cioè la comunicazione bidirezionale esistente fra microbiota intestinale e sistema nervoso centrale (Carabotti et al., 2015). È stato rilevato come alterazioni del microbiota intestinale (disbiosi) possano influenzare alcuni comportamenti, quali l'umore o lo stato di depressione su animali di laboratorio. La cosa potrebbe sorprendere, ma in realtà esistono dei farmaci che agiscono sugli stati di depressione o di ansia. Non c'è quindi da stupirsi se tali molecole, invece che essere ingerite sotto forma di pillole, possano essere direttamente prodotte da microrganismi che si trovano nell'intestino.

RIASSUNTO

I batteri lattici costituiscono un'ampia categoria di microrganismi piuttosto diffusi sul nostro pianeta. Essendo individui esigenti dal punto di vista metabolico, si ritrovano con facilità in ambienti ricchi di sostanze nutritive. Tra questi, l'intestino animale e umano rappresentano degli ottimi habitat in cui questi microrganismi sono ben presenti e partecipano in modo significativo ai processi metabolici. Con il termine probiotici (dal greco

pro bios, a favore della vita) si intendono microrganismi «che si dimostrano in grado, una volta ingeriti in adeguate quantità, di esercitare funzioni benefiche per l'organismo». Negli ultimi anni si è assistito a un crescente interesse sia scientifico che commerciale verso questi microrganismi, prevalentemente appartenenti alla categoria dei batteri lattici. Ciò ha portato all'isolamento, identificazione e caratterizzazione di un buon numero di ceppi potenzialmente probiotici che hanno dimostrato possedere interessanti attività benefiche in vitro. Il mantenimento di tali attività anche in vivo, su animali di laboratorio e ancor più sull'uomo, presenta indubbiamente delle difficoltà, legate principalmente al fatto che il probiotico, una volta ingerito, si trova a interagire con il microbiota intestinale, costituito da un'enorme popolazione di alcune migliaia di miliardi di batteri, molto ben adattati allo specifico ambiente. Tale problematica convivenza normalmente influenza il comportamento del probiotico, finendo per interferire anche con lo sviluppo della sua attività benefica.

ABSTRACT

Expectations from and limitations of the lactic, probiotic ferments. Lactic acid bacteria represent a large group of microorganisms quite widespread on our planet. Being metabolically demanding, they can be easily found in nutrient-rich environments. Among these, animal and human intestines represent excellent habitats where these microorganisms are present and participate significantly to metabolic processes. The term probiotics (from the Greek *pro bios*, in favor of life) refers to microorganisms «which prove capable, once ingested in adequate amounts, of exercising beneficial functions for the organism». In the recent years there has been an upsurge of scientific and commercial interest on these microorganisms, which mainly belong to the lactic acid bacteria group. This has led to the isolation, identification, and characterization of a number of potentially probiotic strains showing interesting beneficial activities in vitro. The maintenance of these activities also in vivo, in laboratory animals and humans, undoubtedly presents some difficulties, mainly linked to the fact that the probiotic, once ingested, must interact with the intestinal microbiota, consisting of a huge population of several trillions of bacteria, very well adapted to that specific environment. This problematic coexistence normally influences the behavior of the probiotic microbe, eventually interfering with the development of its beneficial activity.

BIBLIOGRAFIA

- CARABOTTI M., SCIROCCO A., MASELLI M. A., SEVERIA C. (2015): *The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems*, «Annals of Gastroenterology», 28 (2), pp. 203-209.
- DUARTE V., CRUZ B. C.S., TARRAH A., DIAS R.S., MOREIRA L.P.D., LEMOS JUNIOR W.J.F., SILVA L.C.F., SANTANA G.R., DE OLIVEIRA L.L., PELUZIO M.D.C.G., MANTOVANI H.C., CORICH V., GIACOMINI A., OLIVEIRA P.S. (2020): *Chemoprevention of DMH-induced early colon carcinogenesis in male balb/c mice by administration of Lactobacillus*

- paracasei *DTA81*, «Microorganisms», 8 (12), pp. 1-22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121994>
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002): *Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*, Food and Agricultural Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>
- HYEMIN K., YULAH J., JI-EUN K., YONG GYONG K., NAM-SOO P., CHANG-HO K. (2021): *Anti-obesity potential of Lactobacillus spp. isolated from infant faeces*, «Biotechnology and Bioprocess Engineering», 26 (4), pp. 575-585. <https://doi.org/10.1007/s12257-020-0309-x>
- LILLY D.M., STILWELL R.H. (1965): *Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms*, «Science», 147, pp. 747-748. <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>
- PAKROO S., GHION G., TARRAH A., GIACOMINI A., CORICH V. (2021): *Effects of 2-fucosyllactose-based encapsulation on probiotic properties in Streptococcus thermophilus*, «Applied Sciences», 11, 5761. <https://doi.org/10.3390/app11135761>
- PENKA P., KALOYAN P. (2017): Chapter 7. *Prebiotic-Probiotic Relationship: The Genetic Fundamentals of Polysaccharides Conversion by Bifidobacterium and Lactobacillus Genera*, in *Handbook of Food Bioengineering*, Editor(s): A.M. Grumezescu, A.M. Holban, Academic Press, pp. 237-278, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811413-1.00007-3>
- SCOURBOUTAKOS M.J., FRANCO-ARELLANO B., MURPHY S.A., NORSEN S., COMELLI E.M., L'ABBÉ M.R. (2017): *Mismatch between probiotic benefits in trials versus food products*, «Nutrients», 9 (4), p. 400. <https://doi.org/10.3390/nu9040400>
- TARRAH A., DA SILVA DUARTE V., DE CASTILHOS J., PAKROO S., LEMOS JUNIOR W.J.F., LUCHESE R.H., FIORAVANTE GUERRA A., ROSSI R.C., RIGHETTO ZIEGLER D., CORICH V., GIACOMINI A. (2019): *Probiotic potential and biofilm inhibitory activity of Lactobacillus casei group strains isolated from infant feces*, «Journal of Functional Foods», 54, pp. 489-497. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.004>
- WASSIE M., WASSIE T. (2016): *Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk*, «International Journal of Advanced Research in Biological Sciences», 3 (8), pp. 44-49. <https://ijarbs.com/pdfcopy/aug2016/ijarbs8.pdf>

VIVIANA CORICH^{1,2}, ALESSIO GIACOMINI^{1,2}, CHIARA NADAI²

L'evoluzione del lievito starter per la gestione della fermentazione alcolica

¹ Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente (DAFNAE),
Università degli Studi di Padova

² Centro Interdipartimentale per la Ricerca in Viticoltura ed Enologia (CIRVE), Università degli
Studi di Padova

L'ORIGINE DEL LIEVITO STARTER

La fermentazione alcolica del succo d'uva è un processo che si origina spontaneamente. Infatti, sono i lieviti naturalmente presenti sulla sua superficie che innescano la trasformazione degli zuccheri in etanolo. In particolare, sono quelli più abbondanti, definiti tradizionalmente apiculati, che si affermano per primi. Tuttavia, gli apiculati resistono molto poco all'alcol, per cui appena il grado alcolico sale cedono il passo a quelli, di forma ellittica, poco presenti sul grappolo, ma molto più alcohol tolleranti. Tra gli ellittici si colloca *Saccharomyces cerevisiae*, la specie dotata delle migliori caratteristiche fermentative, in grado di portare a termine il processo consumando tutti gli zuccheri presenti nell'uva (fig. 1). È chiaro quindi che il vino, anche quello industriale, può essere prodotto mediante la fermentazione spontanea, anzi fino agli anni '60 del secolo scorso il processo di vinificazione si basava proprio su questa tipologia di fermentazione. Un processo interessantissimo dal punto di vista microbiologico, poiché coinvolge l'intera comunità microbica presente sul frutto della vite. Tuttavia, dal punto di vista tecnologico comporta alcune difficoltà. Infatti, se nella comunità microbica non sono presenti le specie più alcol tolleranti, è possibile che si verifichino blocchi di fermentazione che lasciano una grande quantità di zuccheri residui. Inoltre, poiché la comunità microbica può variare nelle diverse annate, il vino prodotto assumerà caratteristiche organolettiche diverse ogni anno.

Per questi motivi in passato sono stati sviluppati progetti di selezione che hanno permesso di identificare, nel mosto in fermentazione, gli individui, i ceppi, appartenete alla specie *S. cerevisiae* con le migliori caratteristiche tecnologiche. L'evoluzione della tecnologia di produzione e in particolare l'in-

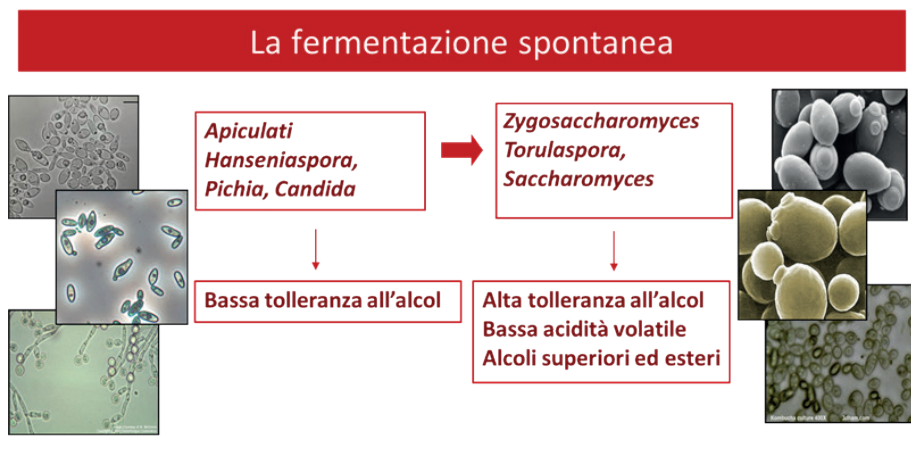


Fig. 1 La successione delle specie di lievito durante la fermentazione spontanea

troduzione di efficaci protocolli di essiccazione della massa ha premesso una capillare diffusione di questi starter selezionati nella forma di lieviti secchi attivi utilizzati a partire dagli anni '60 del secolo scorso. L'uso del lievito selezionato ha garantito la produzione di un vino privo dei principali difetti di fermentazione, standardizzato e quindi adatto ad affrontare un mercato globale (Ciani et al., 2022).

L'EVOLUZIONE PROGRAMMI DI SELEZIONE

I primi lieviti che sono stati commercializzati, definiti di prima generazione, avevano un obiettivo principale: l'eliminazione dei blocchi di fermentazione. Erano tutti lieviti molto alcol resistenti che producevano vini privi dei principali difetti fermentativi (acidità volatile elevata e presenza di odori e sapori anomali). Erano in grado di garantire la standardizzazione del prodotto, che permetteva alle aziende di spingersi oltre il mercato locale. Successivamente è emersa la necessità di migliorare qualitativamente le caratteristiche del vino, attraverso la modulazione degli aromi di fermentazione. Quindi i progetti di selezione si sono concentrati su altre caratteristiche del lievito, associate alla produzione di molecole aromatiche. Sono, perciò, comparsi sul mercato i lieviti di seconda generazione: ceppi con buone *performance* fermentative che attraverso il loro metabolismo producevano molecole, quali esteri e alcoli superiori, in grado di aumentare l'intensità e la qualità organolettica del vino.

Questi lieviti lasciavano un'impronta aromatica nel vino, che si riconosce facilmente anche quando la matrice vegetale è diversa. Questo ovviamente gioca a scapito dell'identità del prodotto e a favore di una standardizzazione eccessiva che confonde il consumatore, rendendolo spesso incapace di riconoscere vini diversi. La nuova esigenza di differenziare i prodotti, ha spinto, perciò, i produttori verso una forte ricerca di identità attraverso la rivalutazione dei vitigni autoctoni, l'associazione del vino alla regione di provenienza, alla tradizione, ai processi tecnologici. In questo contesto sono stati proposti i lieviti di terza generazione, definiti ecotipi. Sono ceppi, appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, isolati nella zona di produzione di uno specifico vino, dotati chiaramente di buone caratteristiche tecnologiche, ma soprattutto in grado di esaltare le caratteristiche di qualità desiderate in quello specifico prodotto locale (Corich et al., 2022).

LA SELEZIONE DEI LIEVITI ECOTIPICI

Un'importante attività di selezione di lieviti ecotipici ha riguardato tre aree a vocazione enologica del Veneto (fig. 2). La prima è quella che coincide con la zona di produzione del Prosecco DOCG un vino spumante ottenuto a partire da uve Glera. In questo caso la ricerca era finalizzata all'ottenimento di uno starter per la produzione del vino base. La seconda è la zona appartenenti ai territori della DOC Piave dedicata alla coltivazione di un vitigno autoctono, il Raboso da cui si ottiene il vino rosso omonimo caratterizzato da un elevato grado alcolico e una notevole acidità. La terza coincide con la zona di coltivazione del vitigno Tai, nella DOC Lison-Pramaggiore, che origina un vino bianco con una buona gradazione alcolica, il Bianco DOC. In questi progetti di selezione è stato impiegato un protocollo appositamente modificato.

Innanzitutto, è stato effettuato un massiccio campionamento di grappoli in vigneto, ciascuno trasferito in laboratori dove è stato fermentato singolarmente. In passato l'ambiente enologico da cui venivano isolati i lieviti era il mosto in fermentazione. A causa dell'ampio utilizzo di lieviti selezionati, non è più possibile effettuare isolamenti dalla cantina. Ciascun grappolo in fermentazione che aveva superato otto gradi alcolici, veniva campionato e i lieviti isolati su terreno di coltura (fig. 3). Dopo avere ristricciato le singole colonie su terreno di crescita per ottenere popolazioni clonali, ciascun lievito è stato sottoposto a un'analisi genetica per stabilire innanzitutto la specie e il ceppo di appartenenza. Grazie alle indagini molecolari è stato possibile eliminare tutti i lieviti non appartenenti alla specie *S. cerevisiae* e raggruppare gli isolati in base al profilo genetico (genotipo). Questo ha permesso di ridurre il numero di lie-

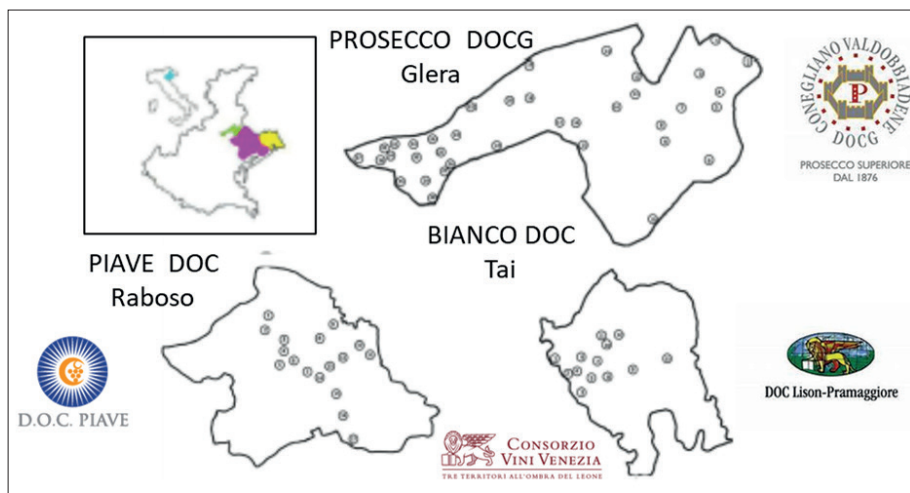


Fig. 2 Regioni a vocazione vitivinicola in cui si è svolta la selezione. I dischi grigi indicano le aree di campionamento (modificato da Viel et al., 2017)

viti da sottoporre a caratterizzazione fisiologica. Successivamente i ceppi così individuati sono stati sottoposti a una blanda indagine tecnologica che ha previsto la valutazione dell'andamento fermentativo in mosto sintetico standard e della produzione di composti solforati. In questo modo sono stati scartati solo i ceppi con cinetiche fermentative molto lente e con produzione evidente di odori sgradevoli. È stato invece dato ampio spazio a una valutazione organolettica degli aromi prodotti dai singoli lieviti durante fermentazioni su scala di laboratorio (100ml) in mosto naturale. Dopo filtrazione i fermentati così ottenuti sono stati sottoposti a una valutazione olfattiva (la degustazione non è stata possibile a causa dei volumi molto ridotti) da parte di un panel di esperti. Lo scopo, infatti, non era quello di identificare un lievito con ottime qualità tecnologiche ma un individuo in grado di esaltare le caratteristiche di quella particolare tipologia di vino. Quindi sono stati eliminati tutti i ceppi che, pur mostrando adeguate cinetiche di fermentazione, fornivano al vino aromi che non venivano considerati identitari. I ceppi rimasti sono stati sottoposti a una caratterizzazione tecnologica più approfondita e impiegati come starter in processi di microvinificazioni e vinificazione industriale. Ripetute sedute di analisi sensoriali sui vini prodotti ha permesso l'identificazione dei ceppi migliori. La scelta di isolare i lieviti da singoli grappoli d'uva fermentati raccolti attraverso un campionamento capillare dei vigneti ha permesso di ottenere una mappa dettagliata della presenza di *S. cerevisiae* nelle aree vitivinicole considerate (Viel et al., 2017).



Fig. 3 Il protocollo di selezione

LA PRESENZA DI «S. CEREVISIAE» IN VIGNETO

Le indagini genetiche effettuate hanno permesso di quantificare la variabilità genetica presente e posizionare i singoli ceppi nelle zone di isolamento. È stato osservato che esistono notevoli differenze nella quantità e nella distribuzione dei ceppi nelle tre aree. In particolare, le due varietà a bacca bianca hanno permesso l'isolamento di un numero notevolmente inferiore non solo isolati appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, ma anche di ceppi (tab. 1). In particolare, per quanto riguarda la varietà Glera, la maggior parte dei lieviti è stata isolata nella zona collinare di Valdobbiadene, mentre quella pianeggiante del coneglianese ha dato risultati più scarsi. Nell'area della DOC Raboso *S. cerevisiae* è distribuito in modo più uniforme. Questi risultati mettono in luce alcuni aspetti di natura ecologica che riguardano la specie *S. cerevisiae*: la sua presenza in vigneto è infatti di notevole importanza. Innanzitutto, perché il vigneto è un serbatoio di nuovi ceppi al quale attingere nel momento in cui si generano nuove esigenze nella produzione dei vini. Inoltre, è un indice del livello di

Area	Vino	Vitigno	Grappoli	<i>S. cerevisiae</i> nei grappoli (%)	Genotipi
Prosecco DOCG	Prosecco	Glera	354	8,5	37
Piave DOC	Raboso	Raboso	78	69,2	130
Lison - Pramaggiore DOC	Bianco	Tai	192	6,2	9

Tab. 1 Frequenze di isolamento di *S. cerevisiae* dopo la fermentazione dei singoli grappoli e numero di ceppi (genotipi) individuati

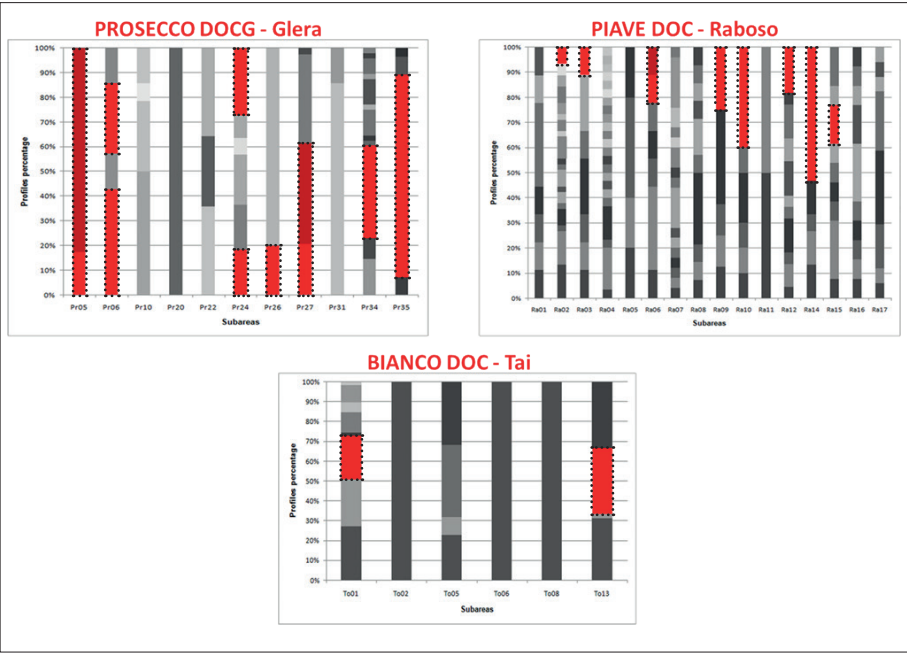


Fig. 4 Frequenza dei ceppi in ciascuna parcella campionata. Ad ogni sfumatura di grigio corrisponde un singolo genotipo; con i bordi puntinati i genotipi sovrapponibili a quelli di ceppi commerciali (Viel et al., 2017)

variabilità genetica generale del sistema vigneto, che può essere messo in relazione con l'attività umana e permette quindi di valutare, dal punto di vista microbiologico l'impatto di questa sull'ambiente. A questo proposito, sono stati sottoposti ad analisi genetica anche un elevato numero di ceppi commerciali (circa 80), tra cui quelli più impiegati dai produttori nelle aree campionate, e confrontati con gli isolati naturali. È stata osservata la presenza di un certo numero ceppi commerciali tra gli isolati provenienti dai vigneti, soprattutto nelle aree dove è stata riscontrata la variabilità genetica più bassa (fig. 4).

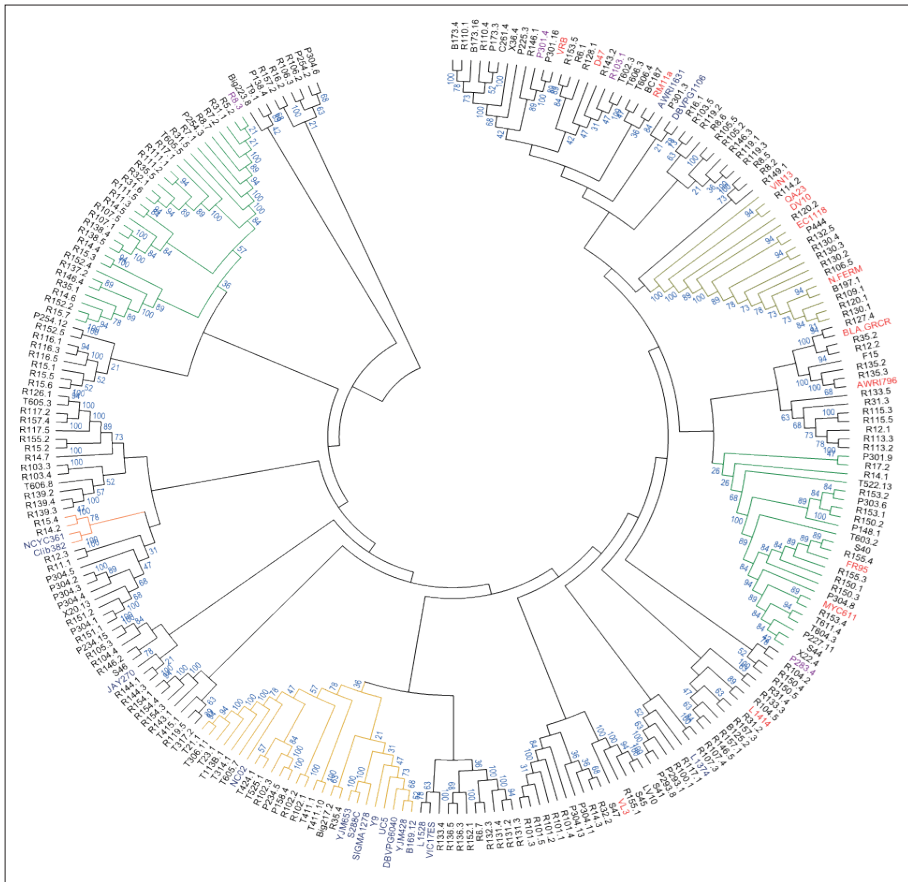


Fig. 5 Dendrogramma ottenuto mediante confronto dei profili di amplificazione dei microsatelliti. Con la lettera iniziale P, R e T sono indicati gli isolati provenienti rispettivamente dalle aree Prosecco DOCG, Piave e Lison-Pramaggiore. In altri colori sono indicati i nomi di ceppi di riferimento di diversa origine, inseriti come controlli (Viel et al., 2017)

Un risultato interessante emerso da questi studi consiste nell'aver identificato ceppi sempre diversi in ciascun vigneto campionato: ogni appezzamento, quindi, è dotato di ceppi specifici che potrebbero potenzialmente contribuire alla costruzione dell'identità del vino. Tuttavia, il fatto che i ceppi siano geneticamente diversi non significa che lo siano anche dal punto di vista fisiologico e quindi che ciò si rifletta sulla qualità del vino e sulla sua identità. Per questo motivo i ceppi collezionati sono stati indagati ulteriormente mediante l'analisi molecolare dei microsatelli, piccole regioni ipervariabili sparse nel genoma (fig. 5). Tramite quest'analisi, attraverso la determinazione del grado di ete-

rozigosi posseduto dalle diverse popolazioni, è possibile evidenziare il livello di parentela tra i ceppi e quindi quantificare il livello di diversità. Maggiore è l'eterozigosi misurata tra le popolazioni, maggiore è il grado di parentela e quindi minore sono le differenze fisiologiche tra i ceppi. È stato osservato che le due popolazioni isolate da uve Glera e Raboso possedevano un grado elevato di eterozigosi. Inoltre, il profilo genetico di alcuni era simile a quello di importanti ceppi commerciali. Le aree del Prosecco DOC e Piave DOC sono confinate e i ceppi hanno avuto la possibilità di mescolarsi. Nel caso dei lieviti provenienti dalla DOC Lison-Pramaggiore è stata osservata la presenza di un gruppo con un livello di eterozigosi molto basso. Questo cluster di individui è molto particolare e tipicamente presente solo in quest'area. Studi di questo tipo sicuramente sono importanti per capire quanto la popolazione microbica presente in vigneto sia specifica di quel territorio, ponendo in questo modo le basi genetiche per una definizione scientifica di *terroir* microbiologico (Viel et al., 2017).

LA SELEZIONE DI LIEVITI NON-«SACCHAROMYCES»

La fermentazione spontanea, come già osservato in precedenza, è un processo di difficile gestione in quanto la comunità microbica può variare a seconda dell'annata e quindi ridurre la standardizzazione del prodotto, oppure, quando la sua composizione non è corretta, originare arresti di fermentazione o composti anomali nel vino. D'altra parte, la presenza di una variabilità a livello di specie e di ceppo elevata, determina un vino in cui il grado di complessità aromatica è molto più elevato rispetto a quello ottenuto con la fermentazione guidata. Questo è legato al fatto che l'intera comunità microbica sta contribuendo al processo fermentativo: non solo decine di specie diverse, ma diverse centinaia di ceppi. Al contrario nella fermentazione guidata è coinvolto un solo ceppo di lievito. Per evitare gli inconvenienti associati ai processi fermentativi spontanei, mantenendone i vantaggi, sarebbe interessante poter ricreare artificialmente la comunità microbica. Proprio in quest'ottica recentemente sono stati avviati progetti di selezione di lievito appartenuti a generi diversi, definiti appunto non-*Saccharomyces*, da impiegare in formule multistarter. Questi lieviti, che per molto tempo sono stati considerati dei contaminanti di cui inibire la crescita mediante l'uso dei solfiti, sono stati studiati e selezionati. È stato quindi osservato che se impiegati in co-inoculo o in inoculo sequenziale con *S. cerevisiae* sono in grado di influenzare positivamente il bouquet del vino (sia in relazione agli aromi di fermentazione che varietali) e il suo gusto e di regolarne l'acidità (Ciani et al., 2022).

IL CASO DI «STARMERELLA BACILLARIS»: UN LIEVITO NON-«SACCHAROMYCES»
VANTAGGIOSO SIA IN CANTINA CHE IN VIGNETO

Questo lievito inizialmente faceva parte della specie *Candida stellata*, un gruppo di lieviti noto da molto tempo e spesso isolato in cantina. È criotollerante quindi cresce meglio a basse temperature, fruttosofilo (al contrario di *S. cerevisiae* che è glucosofilo), ha una spiccata attitudine osmofila. Infatti, i primi isolamenti sono stati effettuati in California da uva sottoposta ad appassimento. Tra le caratteristiche citate la più identitaria è proprio l'osmofilia, ovvero la capacità di crescere in modo ottimale in presenza di elevate concentrazioni di zuccheri, ben più alte di quelle mediamente presenti nel mosto (180-220 g/l). La capacità di resistere agli zuccheri si basa, come in *S. cerevisiae*, sulla produzione di un soluto compatibile, il glicerolo appunto, attraverso la via gliceropiruvica. Il glicerolo, infatti, prodotto in quantità adeguate, bilancia la concentrazione zuccherina esterna, bloccando la fuoriuscita di acqua dalla cellula il suo raggrinzimento. Mentre la sintesi di glicerolo in *S. cerevisiae* è indotta dalla presenza di zuccheri, in *S. bacillaris* la produzione di glicerolo è costantemente attiva. Ciò ne determina, indipendente dalla concentrazione di zuccheri nel mosto, una produzione maggiore. In presenza di elevate concentrazioni di zuccheri (> 300g/l) la quantità di glicerolo prodotta da *S. bacillaris* è talmente elevata da ridurre il grado alcolico del vino (fino all'1%). Dal punto di vista organolettico il glicerolo nel vino è importante in quanto responsabile in bocca del corpo e della sensazione di dolce (Lemos et al., 2022). *S. bacillaris* condivide con la maggior parte dei non-*Saccharomyces* una scarsa tolleranza all'alcol, quindi, non è in grado di chiudere in modo corretto la fermentazione alcolica, ovvero consumando tutti gli zuccheri presenti nel mosto. Quindi viene impiegata in inoculo sequenziale con *S. cerevisiae*: *S. bacillaris* viene inoculata per prima e generalmente dopo 48 ore viene introdotto *S. cerevisiae* che riesce a chiudere la fermentazione. L'andamento fermentativo dell'inoculo sequenziale è più lento rispetto a quello ottenuto con l'inoculo di *S. cerevisiae* (fig. 6). Il rallentamento della cinetica di frammentazione è dovuta all'interazione tra i lieviti che si verifica durante il processo. Questo però non inficia il risultato, infatti la fermentazione si chiude regolarmente (Nadai et al., 2021).

Recentemente è stato osservato che quando *S. bacillaris* viene utilizzata in inoculo sequenziale con *S. cerevisiae* la stabilità proteica del vino bianco migliora, in modo proporzionale al grado di instabilità e alla concentrazione delle proteine del vino (fig. 7). L'uso di *S. bacillaris* potenzialmente permette di ridurre l'impiego di bentonite, necessaria nel processo di filtrazione del vino per eliminare la frazione di proteine vegetali instabili, incrementando in questo modo la sostenibilità del processo enologico (Moreira et al., 2022).

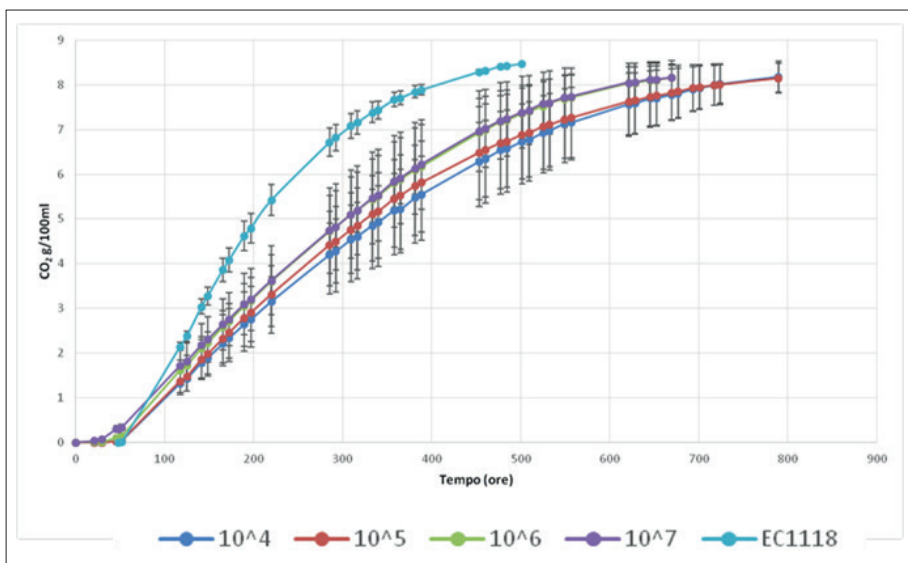


Fig. 6 Cinetica di fermentazione di *S. bacillaris* in fermentazione sequenziale a concentrazioni di inoculo crescenti (da 10^4 CFU/ml a 10^7 CFU/ml). In azzurro la cinetica di fermentazione di *S. cerevisiae* in inoculo singolo. In ogni prova la concentrazione di inoculo di *S. cerevisiae* è stata 10^6 CFU/ml (Nadai et al., 2021)

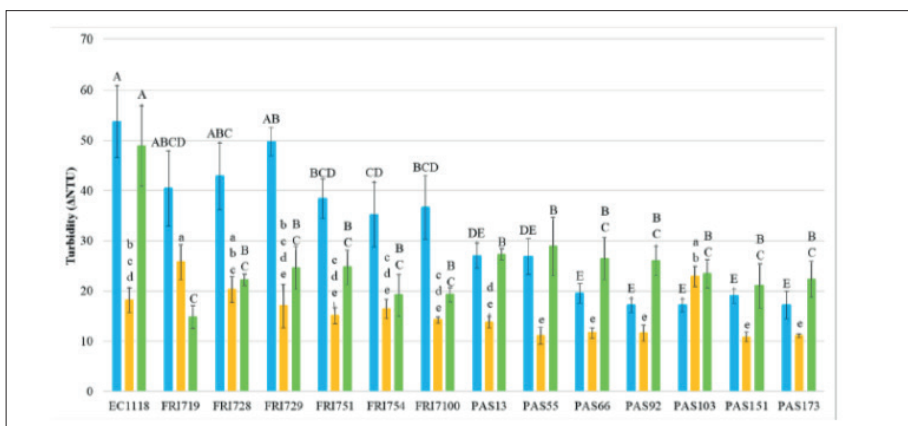


Fig. 7 Torbidità, misurata dopo test a caldo, di vini ottenuti con 13 ceppi di *S. bacillaris* in fermentazioni sequenziali. Barra azzurra: Sauvignon blanc; barra gialla: Pinot grigio; barra verde: Manzoni bianco. EC1118: vini ottenuti inoculando *S. cerevisiae* singolarmente (Moreira et al., 2022)

Infine, *S. bacillaris* ha mostrato una spiccata attività antimicrobica nei confronti di *Botrytis cinerea*, uno dei principali patogeni della vite in grado di svilupparsi sul grappolo maturo. L'attività antimicrobica è stata osservata

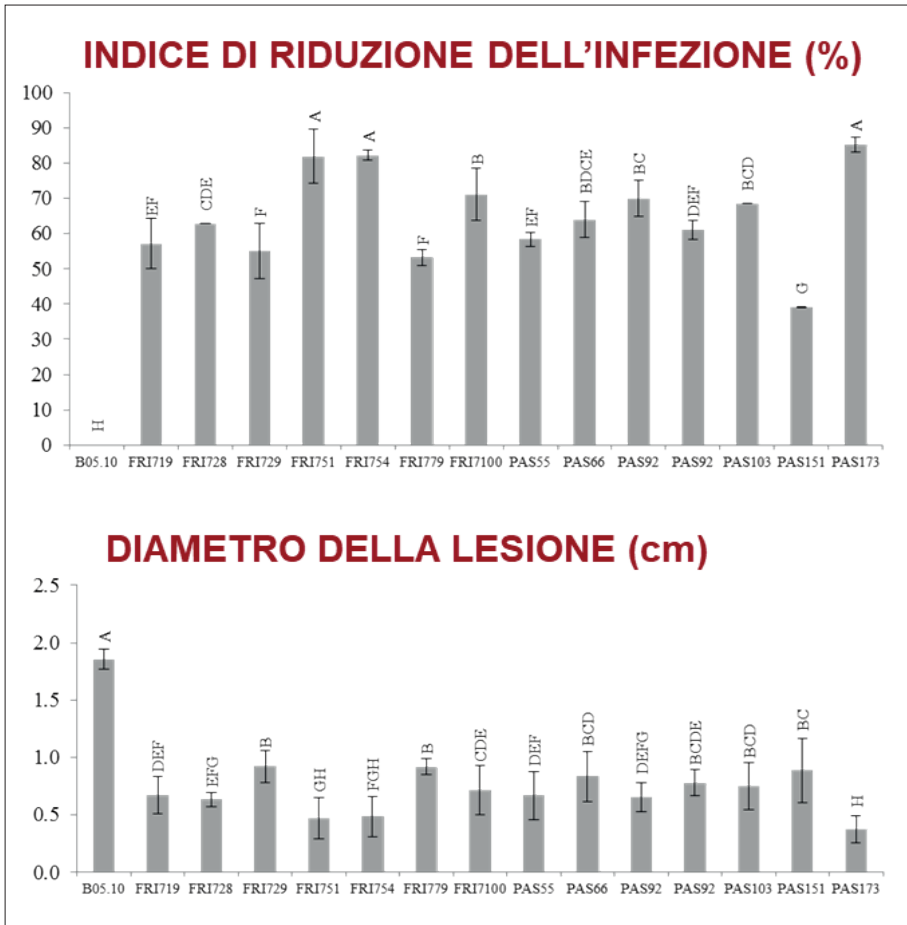


Fig. 8 Test di infezione su acino. Sono stati testati 14 ceppi di *S. bacillaris*. B05.10: controllo inoculato solo con *Botrytis cinerea* (Lemos et al., 2016)

sia su piastra, quando questo lievito veniva cresciuto in presenza del fungo antagonista, che in test sull'uva. Gli acini sono stati lesionati artificialmente, nella lesione sono state introdotte le spore del fungo e cellule di lievito a concentrazioni note. È stato osservato che il diametro della lesione era minore in presenza del lievito, determinando un indice di riduzione della lesione significativamente molto maggiore (Lemos et al., 2016; Nadai et al., 2018).

CONCLUSIONI

L'evoluzione del lievito starter ha condotto alla produzione di lieviti ecotipi che permettono di esaltare il carattere identitario di un vino, esigenza molto sentita dall'enologia moderna.

Lo studio e l'isolamento di questi lieviti direttamente dal vigneto ha permesso di approfondire il concetto di *terroir* microbiologico, suggerendo che la sola identificazione di ceppi specifici non basta, ma va affiancata dalla definizione del grado di parentela. L'identificazione di starter commerciali in ambiente di vigneto, in grado di colonizzarlo permanentemente ha fornito un ulteriore strumento per la valutazione dell'impatto ambientale dell'industria del vino.

In tempi recenti il ruolo dei lieviti non-*Saccharomyces* nella fermentazione alcolica è stato messo in discussione. Considerati per molto tempo dei contaminanti da eliminare, è stato osservato che, se aggiunti come co-starter, sono in grado di aumentare la complessità aromatica del vino e sono oggi i principali obiettivi dei programmi di selezione. Tra questi, la specie *S. bacillaris* quando usata in inoculo sequenziale con *S. cerevisiae*, incrementa la quantità di glicerolo e influenza in modo positivo la stabilità proteica. Infine, l'attività antifungina espressa da questa specie riduce lo sviluppo di *Botrytis cinerea*, rendendo *S. bacillaris* potenzialmente interessante come agente di biocontrollo in vigneto. Sono in corso studi per verificare l'effetto di questo lievito inoculato in vigneto, sulla successiva fermentazione alcolica e sulla qualità del vino.

RIASSUNTO

L'utilizzo ormai costante e generalizzato, nel processo di vinificazione, di colture selezionate contenenti il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, è una pratica diffusa a livello mondiale. Il loro utilizzo, tuttavia, da una parte garantisce il pronto avvio della fermentazione alcolica e una buona e costante qualità del prodotto, dall'altra ne provoca un effetto di standardizzazione. Questo dipende dal fatto che il mercato internazionale del lievito offre un numero relativamente limitato di ceppi che vengono ogni anno impiegati contemporaneamente in molti paesi produttori di vino. Questo fenomeno sicuramente non favorisce l'esaltazione delle caratteristiche identitarie dei vini, il così detto "terroir" che i Paesi con una importante tradizione vitivinicola utilizzano come punto di forza per proporre i loro prodotti sul mercato mondiale. In questo contesto la selezione di lieviti autoctoni, come starter, rappresenta una soluzione efficace. Questa nuova tipologia di colture selezionate viene proposta per essere impiegata principalmente nella zona di isolamento e questi lieviti sono selezionati seguendo le specifiche caratteristiche del vino. Recentemente, per ridurre l'effetto di standardizzazione sono stati proposti anche nuovi starter a base di lieviti non-*Saccharomyces*. Questi ultimi, tradizionalmente responsabili dell'insorgenza di difetti

nei vini, hanno dimostrato che, se gestiti in modo corretto, contribuiscono a rendere più complesso l'aroma dei vini e quindi a migliorarne la qualità.

ABSTRACT

The now constant and generalized use of selected starter culture, based on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is a widespread practice in the winemaking process. Although it guarantees the prompt start of alcoholic fermentation and a good and constant quality of the product, a remarkable effect of organoleptic standardization is reported. This is due to the fact that the global yeast market offers a relatively limited number of strains that are used simultaneously in many wine producing countries every year. This aspect certainly contributes to mask the wine identity, related to the concept of *terroir* that is the strength of wine communication for countries with important winemaking tradition. In this context, the selection of autochthonous yeasts, as starters, represents an effective solution. These new *Saccharomyces cerevisiae* strains are proposed to be used mainly in the isolation area and they are selected to match the aromatic profiles of specific wines. Recently, new starters, based on non-*Saccharomyces* yeasts, have also been proposed to reduce the standardization effect. This group, traditionally responsible for the onset of defects in wines, has demonstrated that, if managed correctly, they contribute to making the aroma of wines more complex and therefore to improving wine quality.

BIBLIOGRAFIA

- CIANI M., COMITINI F., CANONICO L. (2022): *Fermentazione guidata*, in *Microbiologia del vino e della vite*, P. Romano, M. Ciani, L. Cocolin, Zanichelli, Bologna, pp. 126-139.
- CORICH V., NADAI C., GIACOMINI A. (2022): *Lieviti selezionati*, in *Microbiologia del vino e della vite*, P. Romano, M. Ciani, L. Cocolin, Zanichelli, Bologna, pp. 112-125.
- LEMO JUNIOR W.J.F., DE OLIVEIRA V.S., GUERRA A.F., GIACOMINI A., CORICH V. (2021): *From the vineyard to the cellar: new insights of Starmerella bacillaris (synonym Candida zemplinina) technological properties and genomic perspective*, «Applied Microbiology and Biotechnology», 105 (2), pp. 493-501.
- LEMO JUNIOR W.J.F., BOVO B., NADAI C., CROSATO G., CARLOT M., FAVARON F., GIACOMINI A., CORICH V. (2016): *Biocontrol ability and action mechanism of Starmerella bacillaris (synonym Candida zemplinina) isolated from wine musts against gray mold disease agent Botrytis cinerea on grape and their effects on alcoholic fermentation*, «Frontiers in Microbiology», 7, p. 1249.
- MOREIRA L.D.P.D., NADAI C., DA SILVA DUARTE V., BREARLEY-SMITH E.J., MARANGON M., VINCENZI S., GIACOMINI A., CORICH V. (2022): *Starmerella bacillaris strains used in sequential alcoholic fermentation with Saccharomyces cerevisiae improves protein stability in white wines*, «Fermentation», 8 (6), p. 252.
- NADAI C., DA SILVA DUARTE V., SICA J., VINCENZI S., CARLOT M., GIACOMINI A., CORICH V. (2023): *Starmerella bacillaris released in vineyards at different concentrations Influences wine Glycerol content depending on the vinification protocols*, «Foods», 12 (1), p. 3.

- NADAI C., GIACOMINI A., CORICH V. (2021): *The addition of wine yeast Starmerella bacillaris to grape skin surface influences must fermentation and glycerol production*, «OENO One», 55 (2), pp. 47-55.
- NADAI C., FERNANDES LEMOS W.J., FAVARON F., GIACOMINI A., CORICH V. (2018): *Bio-control activity of Starmerella bacillaris yeast against blue mold disease on apple fruit and its effect on cider fermentation*, «PloS one», 13 (9), e0204350.
- VIEL A., LEGRAS J.L., NADAI C., CARLOT M., LOMBARDI A., CRESPIAN M., MIGLIARO D., GIACOMINI A., CORICH V. (2017): *The geographic distribution of Saccharomyces cerevisiae isolates within three Italian neighboring winemaking regions reveals strong differences in yeast abundance, genetic diversity and industrial strain dissemination*, «Frontiers in microbiology», 8, p. 1595.

GIOVANNI VALLINI¹

Contributo delle biotecnologie microbiche in risposta al cambiamento climatico: bioprocessi per la decarbonizzazione e la produzione di energia rinnovabile

¹ già professore ordinario di Microbiologia Agraria e direttore del Dipartimento di Biotecnologie,
Università di Verona

INTRODUZIONE

Le biotecnologie offrono opportunità di grande rilevanza per la riduzione a breve termine dei gas serra (*greenhouse gases*, GHG) e strumenti davvero innovativi per combattere il cambiamento climatico a lungo termine. Le politiche a sostegno dello sviluppo e della diffusione di soluzioni basate sulle biotecnologie per fronteggiare il riscaldamento del Pianeta dovrebbero far parte degli sforzi di qualsiasi governo nazionale per contribuire alla mitigazione del cambiamento climatico.

Questo documento esamina gli attuali contributi delle biotecnologie alla mitigazione di gas climalteranti, identificando le soluzioni ormai consolidate e quelle invece emergenti, basate sullo sfruttamento della catalisi microbica e dotate delle maggiori potenzialità per incidere in maniera sostanziale sull'inversione del cambiamento climatico. Tutto ciò, sia attraverso la produzione di matrici energetiche rinnovabili e a ridotta impronta di carbonio (biocarburanti), sia attraverso la cattura, l'uso e lo stoccaggio del carbonio liberato nei processi di combustione in forma di CO₂ (tecnologie *Biomass Energy* [o *Bio-Energy*] *with Carbon Capture and Storage*, BECCS).

Per la maggior parte dell'esistenza del genere umano protrattasi sul nostro Pianeta, la vita è stata sostenuta dallo sfruttamento di prodotti riconducibili a biomassa rinnovabile: piante e altre matrici organiche da specie viventi. Negli ultimi 150 anni, tuttavia, gran parte della nostra economia è diventata dipendente dal petrolio e da altre risorse non rinnovabili di natura fossile. Le conseguenze ambientali di questo passaggio, dalle risorse rinnovabili alle risorse non rinnovabili, sono ben documentate e ormai sotto gli occhi di tutti (Lelieveld et al., 2019). Al netto del sostanziale contributo dei combustibili fossili

alle emissioni climalteranti, giusto per avere un'idea delle dimensioni di un altro problema legato all'impiego massiccio di fonti energetiche non rinnovabili, basta ricordare che i soli Stati Uniti hanno consumato – nel 2019, prima della pandemia – oltre 7,5 miliardi di barili di petrolio (più di 1 miliardo di tonnellate), parte dei quali è stata trasformata in plastica. Questa situazione – se riportata alla serie degli anni a noi più vicini – ha significato negli USA il rilascio su base annua di 35 milioni di tonnellate di residui plastici nell'ambiente insieme al flusso complessivo dei rifiuti (EIA, 2021; Statista, 2021).

Fortunatamente, le biotecnologie hanno d'altra parte fornito e continuano a offrire alternative più sostenibili incentrate sull'ottenimento di prodotti cosiddetti *bio-based*, cioè derivanti da matrici biologiche, quali combustibili, polimeri e altre sostanze fin qui ottenute attraverso la chimica del petrolio. In tal senso, interessanti opzioni sono state messe a punto negli ultimi decenni, seppur su questo fronte sia ancora richiesto uno sforzo sostanziale. Le alternative *bio-based* presentano infatti un'impronta di carbonio significativamente ridotta rispetto alle filiere tradizionali, con evidenti vantaggi ambientali. La possibilità di incrementare il peso di queste opzioni rimane comunque strettamente legata alla disponibilità di biomassa sostenibile. Chi oggi si oppone a questa prospettiva ritiene che tale biomassa non potrà esser – in tempi ragionevoli – disponibile in quantità sufficiente per soddisfare la crescente domanda. Le biotecnologie stanno tuttavia dando un contributo sostanziale allo sviluppo di nuovi filiere sostenibili anche per produrre biomassa destinabile alla trasformazione mediante catalisi microbica, per migliorare i raccolti delle colture esistenti e per utilizzare la biomassa che altrimenti sarebbe un rifiuto.

Le biotecnologie si candidano perciò – a pieno titolo – come formidabile strumento nell'ambito delle iniziative di attuazione di una efficace transizione ecologica, in modo specifico, per quanto segue.

Le biotecnologie possono svolgere un ruolo nodale nel rendere sostenibile un ampio novero di cicli produttivi

La produzione industriale è infatti – in generale – un'importante sorgente di gas serra per il ricorso all'uso di caldaie e forni, per l'adozione di processi basati sulla sintesi per via chimica e a causa del rilascio di sostanze gassose ad alto potenziale climalterante come il metano e gli idrocarburi fluorurati. Le biotecnologie offrono in questo ambito una varietà di opzioni per mitigare le emissioni da parte dei suddetti processi, riducendo la necessità dei quantitativi energetici impiegati, rendendo più efficiente la lavorazione dei materiali e sostituendo i composti a oggi utilizzati con altri maggiormente ecocompatibili. Attraverso processi biotecnologici (digestione anaerobica) è possibile sostituire – almeno in parte – il metano di origine fossile con gas naturale a

impronta neutra. In un Paese fortemente industrializzato come gli Stati Uniti, il settore manifatturiero si rende responsabile del 24% delle emissioni totali di gas a effetto serra (EPA, 2021) e sebbene nessuna singola tecnologia o strategia possa risolvere da sola il problema, le biotecnologie offrono opportunità per produzioni industriali a basse emissioni in molti settori.

Le biotecnologie rappresentano un efficace strumento per lo sviluppo di prodotti a basse emissioni di carbonio

Con l'aumento della sempre più ampia consapevolezza della crisi climatica, i consumatori chiedono la disponibilità di servizi a basse emissioni di carbonio e la sostituzione di molti prodotti esistenti con altri a minor impronta ambientale (Carbon Trust, 2022). Ciò significa trovare alternative per servizi e beni di consumo a basse emissioni che forniscano tuttavia lo stesso livello di prestazioni, la medesima durata e siano sostenibili in termini di costo rispetto a quanto ottenuto con processi maturi basati sul consumo di matrici fossili. Di fatto, le biotecnologie consentono l'ottenimento di prodotti per il consumo, cosiddetti a basso tasso di emissioni di carbonio, attraverso la sostituzione delle matrici fossili con la biomassa o con altre materie prime a base di carbonio riciclato, consentendo così una produzione più efficiente e basata sul biologico e soddisfacendo un segmento di mercato sempre più importante.

Le biotecnologie possono contribuire al sequestro del carbonio

Mentre sussiste ancora incertezza circa gli scenari di un futuro sostenibile, alcuni aspetti ricorrono come caratteristica comune in tutte le possibili rappresentazioni. Uno di questi aspetti riguarda il dispiegamento di tecnologie per il sequestro e stoccaggio in grande scala del carbonio (CCS, *Carbon Capture and Storage*), in grado di convertire il carbonio in una forma che non contribuisce al cambiamento climatico, riciclandolo per specifiche produzioni ovvero immagazzinandolo sottoterra. Le tecnologie CCS non rappresentano tuttavia l'unico o financo la soluzione primaria per il contrasto al cambiamento climatico, ma possono di sicuro dare un contributo davvero importante. In questo scenario, le biotecnologie possono rivestire un ruolo fondamentale nell'implementazione delle strategie CCS, rendendole più abbordabili.

Focalizziamo ora la nostra attenzione sullo stato dell'arte in merito alla messa a punto e al rafforzamento delle produzioni ecosostenibili, con riferimento particolare ai biocombustibili, e alle filiere biotecnologiche per la cattura, l'uso e lo stoccaggio del carbonio.

BIOCOMBUSTIBILI A ELEVATA PRESTAZIONE

I biocarburanti liquidi sono stati tra i primi prodotti biotecnologici a essere ottenuti e implementati su larga scala allo scopo di incidere sulle emissioni di gas serra (GHG). In una prima fase (all'incirca, nel periodo compreso tra il 1970 e il 2010), la produzione aveva assunto principalmente la forma dei biocarburanti cosiddetti di prima generazione: bioetanolo e biodiesel, derivati da materie prime come mais e altre derrate amilacee ovvero oli di natura vegetale. Tuttavia, le preoccupazioni rispetto alla concorrenza per queste materie prime con la produzione di alimenti e mangimi zootecnici hanno spinto verso lo sviluppo di biocarburanti liquidi di seconda generazione, prodotti a partire da matrici sempre a bassa intensità di carbonio, quali le biomasse ligno-cellulosiche.

Le filiere per la produzione dei biocarburanti di prima generazione si sono sin qui basate, da una parte, sulla fermentazione a etanolo [bioetanolo] di materie prime ricche di amido o di zuccheri (fig. 1) mentre, dall'altra, sulla trans-esterificazione o – in tempi più recenti – sull'idro-trattamento (idrogenazione) di oli di derivazione vegetale per la produzione di diesel da matrici a bassa intensità di carbonio (biodiesel, BD, nel primo caso, e diesel rinnovabile, RD, nel secondo).

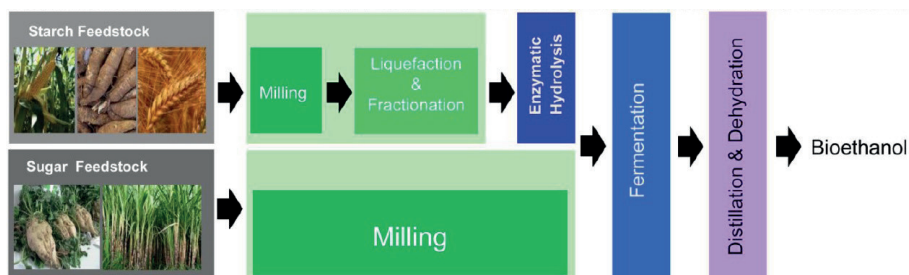


Fig. 1 Produzione di bioetanolo da biomasse di prima generazione (da: Devarapalli & Atiyeh, 2015)

Il biodiesel, costituito da una miscela di esteri metilici degli acidi grassi (*Fatty Acid Methyl Esters*, FAME), rappresenta la prima generazione di biodiesel ed è ottenuto dalla trans-esterificazione di olio vegetale, con metanolo e una base forte (NaOH o KOH) come catalizzatore. Nel processo di trans-esterificazione, il metanolo viene in pratica miscelato con una base, quale – per esempio – NaOH. L'NaOH in metanolo si ionizza. L'-OH reagisce con l' H^+ del metanolo, con formazione di H_2O e contestuale liberazione di $-OCH_3$ che a sua volta reagisce con l'acido grasso (fig. 2).

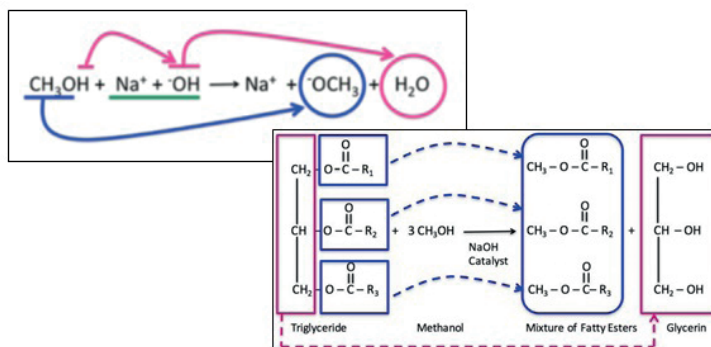


Fig. 2 Produzione di biodiesel mediante processo di trans-esterificazione

Tuttavia, il biodiesel FAME manifesta alcuni inconvenienti come carburante negli attuali motori diesel perché sia i legami $\text{C}=\text{C}$ che i legami $\text{C}=\text{O}$ presenti ne limitano la capacità antiossidante. Inoltre questo tipo di biodiesel è meno infiammabile delle paraffine presenti nel normale diesel da petrolio. Nei propulsori tradizionali il biodiesel FAME deve essere miscelato in percentuale non superiore al 20% ovvero, senza previa miscelazione, in motori di ultima generazione debitamente adattati.

Il biodiesel idrogenato (BHD), noto come biodiesel di nuova generazione o – come sopra accennato – diesel rinnovabile (RD), è prodotto invece – abbiamo detto – a seguito dell'idro- trattamento (idrogenazione) anziché della trans-esterificazione degli oli vegetali di partenza (fig. 3). Il risultato finale è una miscela di paraffine ottenuta a partire dall'olio vegetale iniziale dopo che tutti i doppi legami $\text{C}=\text{C}$ insaturi sono stati idrogenati e tutti gli atomi di ossigeno sono stati eliminati durante il processo di idro-trattamento, con contestuale decarbossilazione. Di conseguenza, la composizione chimica sia del normale diesel da petrolio che del BHD da oli vegetali è largamente la stessa: sono appunto entrambe miscele di paraffine. Il BHD ha perciò caratteristiche prestazionali simili a quelle del gasolio di origine petrolifera, rispetta le stesse specifiche di prodotto e può essere utilizzato in qualsiasi motore diesel, a qualsiasi concentrazione.

Storicamente la maggior parte dei BD e dei RD è stata prodotta a partire – scala mondo – da olio di soia, da olio di palma o da oli derivanti da altre colture dedicate (EPA, 2017). La necessità di nuove materie prime per la produzione di biodiesel è comunque cresciuta nell'ultimo decennio, con conseguente maggior bisogno di substrati di partenza a bassa intensità di carbonio. Alcune di queste nuove materie prime sono rappresentate da prodotti di scarto – come gli oli alimentari di cottura esausti – dei quali tuttavia non è facile la conversione in biodiesel al pari dei substrati nobili di prima generazione.

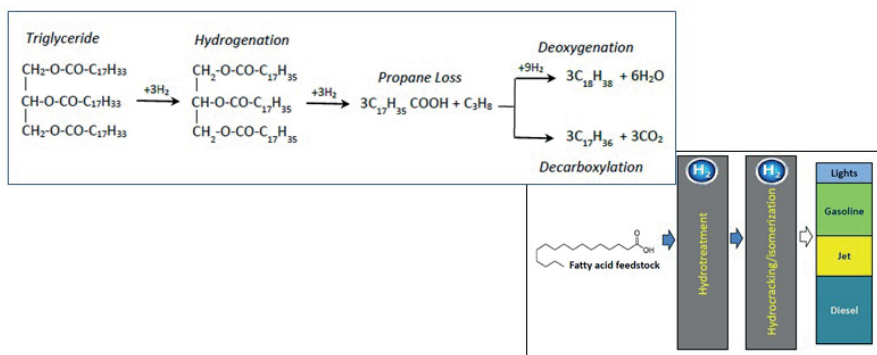


Fig. 3 Idro-trattamento (idrogenazione) di oli vegetali per la produzione di biodiesel di nuova generazione (BDH). Un catalizzatore a base di Ni-Mo promuove la reazione in condizioni di elevata pressione, su un letto a flusso mantenuto a 350 °C in atmosfera di idrogeno a 4 MPa

A questo fine, sono stati sviluppati biocatalizzatori che migliorano l'efficienza di conversione e le caratteristiche prestazionali del biodiesel ottenuto dalle materie prime di scarto (Hobden, 2014), consentendo la trasformazione di una cospicua parte di essi in carburante per il trasporto a bassa emissione di carbonio. La catalisi enzimatica viene condotta prevalentemente ricorrendo a lipasi di origine microbica, derivate da ceppi di batteri (es., tra gli altri, ceppi dei generi *Bacillus* e *Pseudomonas*), funghi filamentosi (es., tra gli altri, ceppi dei generi *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Penicillium* e *Rhizopus*) e lieviti (es., tra gli altri, ceppi dei generi *Candida* e *Rhodotorula*). Di fatto, le lipasi presentano un'eccellente attività catalitica e stabilità in mezzi non-acquosi, associata a regioselettività ed enantioselettività, proprietà queste che facilitano le reazioni di trans-esterificazione (Thangaraj et al., 2019).

Anche sul fronte della produzione biotecnologica di etanolo, recenti progressi nell'isolamento di nuovi efficaci biocatalizzatori (ceppi microbici selvaggi) e nello sviluppo di microrganismi ingegnerizzati (es., tra i batteri, *Clostridium thermocellum*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Clostridium phytofermentans*, *Caldicellulosiruptor bescii* e, nell'ambito dei lieviti, sia ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sia ceppi termotolleranti di *Kluyveromyces marxianus* e *Candida* sp.) hanno reso possibile la produzione di bioetanolo da substrati di seconda generazione di natura ligno-cellulosica, quali piante erbacee e arbustive ovvero colture energetiche dedicate, comunque compatibili con l'esigenza primaria delle produzioni alimentari (Singh et al., 2018).

In questo caso le matrici di partenza sono sottoposte a una prima fase di idrolisi enzimatica per scomporre la cellulosa e l'emicellulosa in gluco-

sio e negli altri zuccheri fermentescibili costituenti. Microrganismi naturalmente in grado di fermentare il glucosio sono stati ingegnerizzati per renderli capaci di fermentare anche zuccheri semplici – sia pentosi (*es.* arabinosio e xilosio) che esosi (*es.* mannosio e galattosio) – derivanti dalle emicellulose, migliorando così le rese e l'efficienza della produzione di bioetanolo (fig. 4).

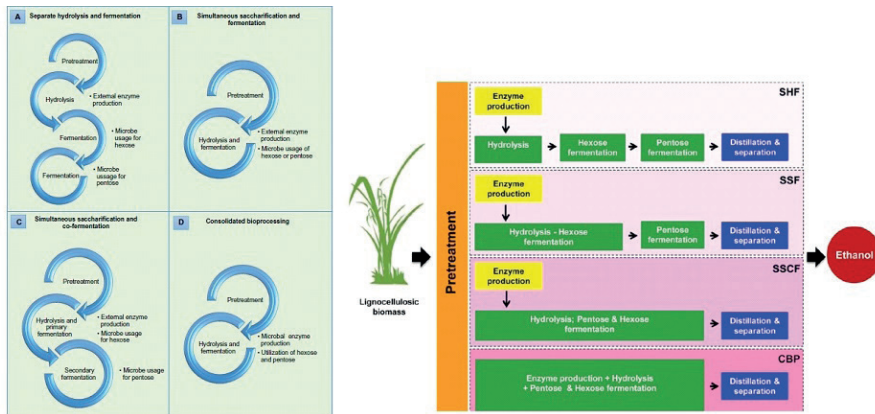


Fig. 4 Configurazione delle diverse filiere di processo per la trasformazione di biomasse ligno-cellulosiche in bioetanolo: (SHF, Separate Hydrolysis & Fermentation) Separazione di idrolisi e fermentazione; (SSF, Simultaneous Saccharification & Fermentation) Saccarificazione e fermentazione simultanee; (SSCF, Simultaneous Saccharification & Co-Fermentation) Saccarificazione e co-fermentazione simultanee; (CBP, Consolidated Bioprocessing); Bioprocessi consolidati vale a dire con la dotazione enzimatica per le fasi dell'intero processo espressa da un singolo microrganismo (schema a sinistra, da: Mbaneme-Smith and Chinn, 2015; schema a destra, da: Hamelinck et al., 2005)

Una fase iniziale assai entusiastica di costruzione di bioraffinerie per la produzione di etanolo da matrici ligno-cellulosiche si è verificata negli USA a partire dal 2009 in seguito all'attuazione del programma federale *Renewable Fuel Standard* (RFS). I maggiori produttori di etanolo di prima generazione – come il gigante POET, LLC – hanno allora collaborato con i principali innovatori in ambito biotecnologico per costruire impianti di biocarburanti da biomasse cellulosiche – primi nel loro genere – negli Stati Uniti, in Europa e in Sud America, anche secondo schemi di processo cosiddetti consolidati (*Consolidated Bioprocessing*, CBP), basati cioè sulla contestuale associazione di produzione enzimatica, idrolisi, saccarificazione e fermentazione dei diversi zuccheri del substrato di partenza in un unico stadio (fig. 5).

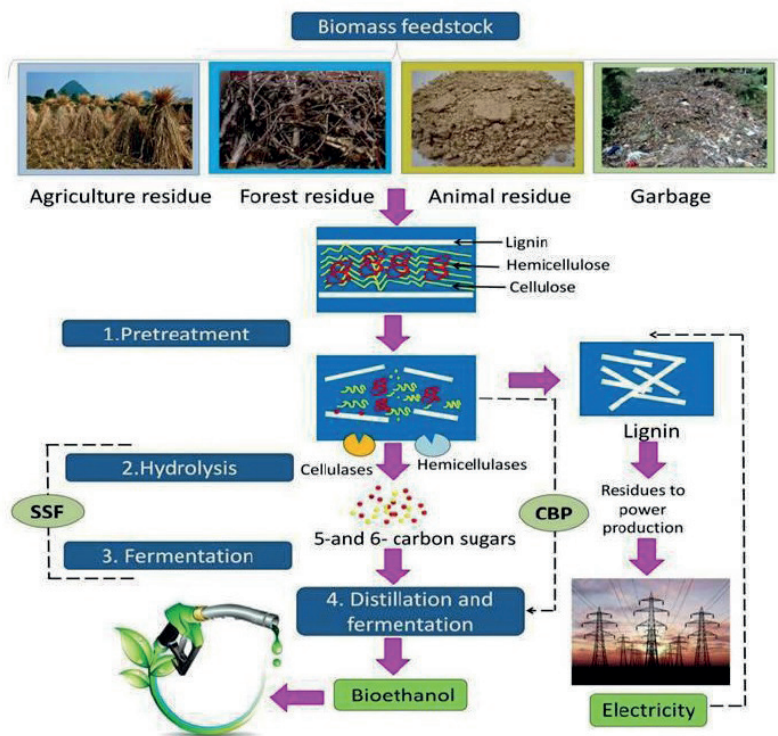


Fig. 5 Rappresentazione schematica del processo per la produzione di bioetanolo a partire da matrici ligno-cellulosiche [SSF = Simultaneous Saccharification and Fermentation; SHF = Separate Hydrolysis and Fermentation; CBP = Consolidated Bioprocessing] (da: Singh et al., 2018)

La piena potenzialità dei biocarburanti ottenuti da substrati ligno-cellulosici per un sostanziale contributo alla mitigazione dei cambiamenti climatici dipenderà tuttavia dall'ampiezza del dispiegamento della tecnologia a valere sui residui agricoli, sui rifiuti solidi urbani (RSU) e su colture energetiche dedicate. Sebbene i bassi prezzi del petrolio abbiano sin qui rappresentato un ostacolo all'affermazione di queste filiere, il deterioramento del quadro internazionale circa gli approvvigionamenti energetici da fonti fossili è destinato comunque a spingere verso un seria riconsiderazione del ricorso ai biocombustibili, al netto della consapevolezza dell'importante ricaduta ecologica di queste produzioni. Altro fattore che ha fino ad oggi limitato un sostanziale impatto positivo derivante dall'uso del bioetanolo in ordine alla mitigazione dei GHG è stato rappresentato dal fatto che l'impiego di questo biocarburante si è dimostrato efficace laddove miscelato con la benzina in misura non su-

periore al 15% in volume, anche se poi la maggior parte delle miscele correnti prevedono un presenza di etanolo intorno al 10%.

Tuttavia, nessuno dei due biocombustibili sin qui presi in considerazione si è rivelato in grado di sostituire combustibili fossili specializzati come il carburante per aerei. È vero però che i progressi tecnologici hanno portato all'ottenimento di una nuova categoria di biocarburanti cosiddetti *drop-in*, così chiamati per la loro capacità di essere impiegati in sostituzione diretta o come integrazione ai carburanti per l'aviazione, senza alcuna modifica dei motori e perciò con un potenziale di decarbonizzazione assai maggiore rispetto a quello raggiungibile nel comparto dei carburanti per autotrazione.

Il biobutanolo (butanolo derivato dalla biomassa) è stato tra i primi ad attirare l'attenzione per le sue proprietà di miscibilità con prodotti petroliferi (proprietà *drop-in*), in quanto ha un comportamento chimico più simile a quello di un idrocarburo rispetto all'etanolo. Sebbene venga ad oggi considerato soprattutto come un intermedio nella produzione di idrocarburi rinnovabili, l'elevato rapporto di equivalenza energetica del biobutanolo rispetto all'etanolo e la capacità di essere miscelato efficacemente con la benzina fino al 16% in volume consentono a questo prodotto di sostituirsi a volumi di benzina corrispondentemente maggiori rispetto al bioetanolo.

Il biobutanolo viene prodotto tramite fermentazione a partire dagli stessi zuccheri semplici utilizzati per la produzione di bioetanolo. Molte specie del genere *Clostridium* sono produttrici naturali di n-butanolo attraverso un percorso acetil-CoA-dipendente. Le specie più note di *clostridia* che producono biobutanolo sono *C. acetobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoacetobutylicum*, *C. aurantibutyricum*, *C. cadaveris*, *C. sporogenes*, *C. pasteurianum* e *C. tetanomorphum*. Alcuni produttori di biocarburanti ricorrono invece a lieviti geneticamente modificati per la sintesi di iso-butanolo (fig. 6).

Il biobutanolo (butanolo + iso-butanolo) può essere prodotto anche da substrati lignocellulosici ricorrendo a ceppi microbici che possiedono proprietà sia cellulolitiche che solventogeniche. Vi è grande interesse a sviluppare questa via di certo meno costosa di un processo in cui la produzione di enzimi idrolitici, la saccharificazione della cellulosa e la fermentazione microbica avvengono separatamente. Bioprocessi consolidati (CBP) sono quelli che vedono coinvolti ceppi ingegnerizzati di *Clostridium cellulolyticum* e *Clostridium cellulovorans* (fig. 7). Il biobutanolo può anche essere ottenuto sfruttando microrganismi ingegnerizzati a partire da carboidrati presenti in alcuni ceppi di microalghe e che rimangono dopo l'estrazione dei lipidi dalla biomassa algale, consentendo così alle microalghe di fungere da materia prima simultanea sia per la produzione di biobutanolo che per la produzione di biodiesel.

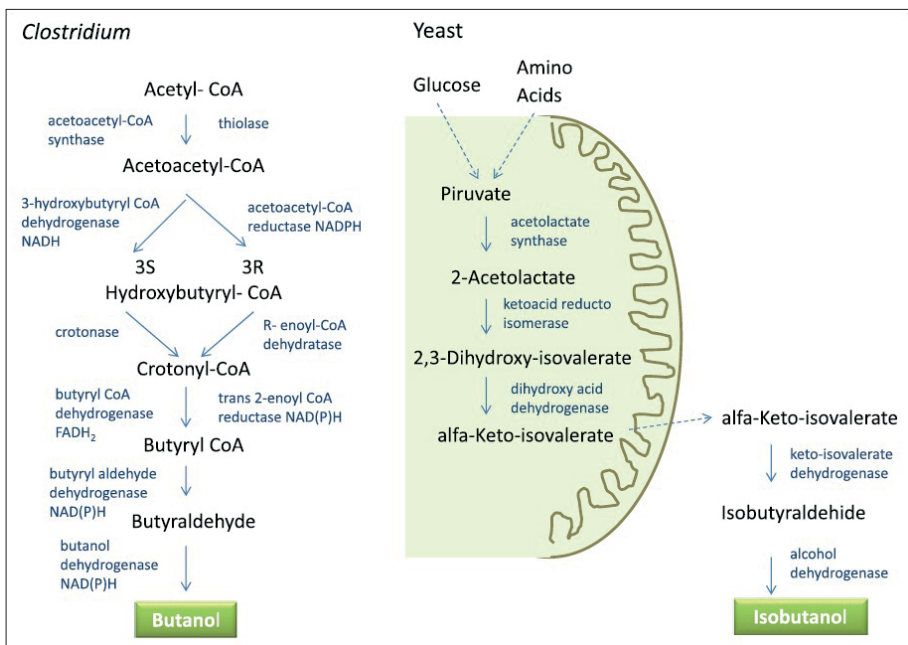


Fig. 6 Schema delle vie metaboliche per la sintesi di biobutanolo nei batteri del genere *Clostridium* e nei lieviti (da: Becerra et al., 2015)

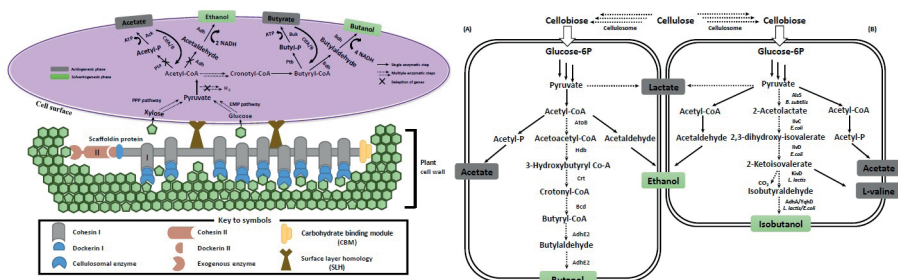


Fig. 7 A sinistra: rappresentazione schematica della sintesi di butanolo a partire da cellulosa mediante bioprocesso consolidato (CBP) da parte delle specie di *Clostridium cellulosoliticum*. È evidenziata la struttura del cellulosoma, comprese le componenti proteiche dei moduli relativi al complesso. A destra: schema delle vie metaboliche in un ceppo di *Clostridium cellulosoliticum* per la produzione combinata di butanolo e isobutanolo da cellulosa mediante bioprocesso consolidato (CBP). [A] La via ingegnerizzata per la sintesi di butanolo; [B] La via ingegnerizzata per la sintesi di isobutanolo (modificato da: Xin et al., 2019)

Come accennato, in tempi più recenti, il biobutanolo ha attirato l'interesse come passaggio chiave verso la produzione di combustibili idrocarburici a

base di iso-ottano da fonti rinnovabili e carburanti per l'aviazione sostenibili in termini ambientali [*Sustainable Aviation Fuel*, SAF]. A differenza del biobutanolo, che è un alcol, l'iso-ottano da fonti rinnovabili e il SAF sono idrocarburi con caratteristiche prestazionali molto simili ai rispettivi omologhi fossili (l'iso-ottano è un importante componente di miscelazione nella benzina). Le proprietà dei bio-alcoli (in pratica, molecole ossigenate) sono di fatto assai diverse da quelle delle miscele di idrocarburi tipiche di benzina, diesel e carburanti per jet.

L'etanolo e il butanolo possono causare problemi di corrosione in motori progettati per funzionare con carburanti idrocarburi. Pertanto, al fine di produrre un carburante *drop-in* a partire dagli alcoli, le differenze nelle proprietà fisiche e chimiche tra quest'ultimi e i carburanti convenzionali devono essere ridotte al minimo. Ciò si può ottenere attraverso il processo che comprende tre fasi: disidratazione dell'alcol, oligomerizzazione e idrogenazione (fig. 8).

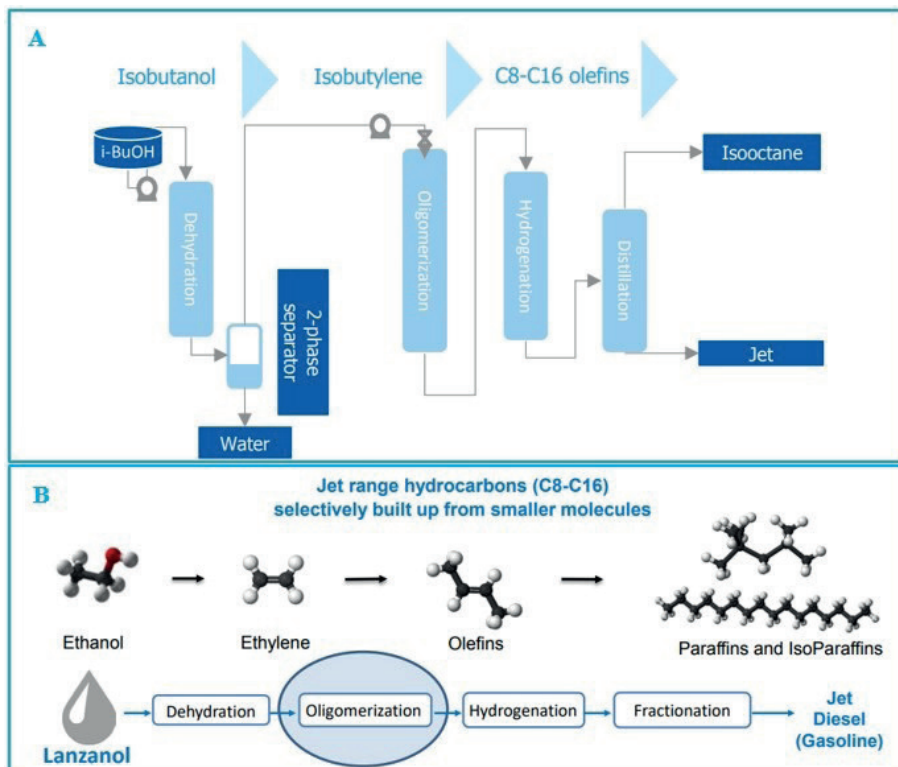


Fig. 8 Schema di processo di conversione dell'iso-butanolo in idrocarburi attraverso passaggio dalle fasi di disidratazione, oligomerizzazione e idrogenazione

Storicamente la conversione di biomasse direttamente in idrocarburi tramite fermentazione ha incontrato il limite nella presenza di ossigeno nei substrati di partenza, presenza che favorisce i microrganismi nella formazione di prodotti ossigenati (in prevalenza, alcoli). L'ingegneria metabolica (fig. 9) – attraverso l'incremento della selettività dei microrganismi fermentanti (batteri e lieviti, soprattutto) – consente oggi di migliorare la resa in idrocarburi, con produzione di una sorta di cherosene, vale a dire una miscela di composti comuni al carburante per aviazione di origine fossile (Kang and Nielsen, 2017). Per altro, gli idrocarburi hanno proprietà idrofobe; non richiedono perciò – in fase di distillazione – il dispendio di elevata energia, così come invece viene richiesto per la raffinazione di alcoli combustibili.

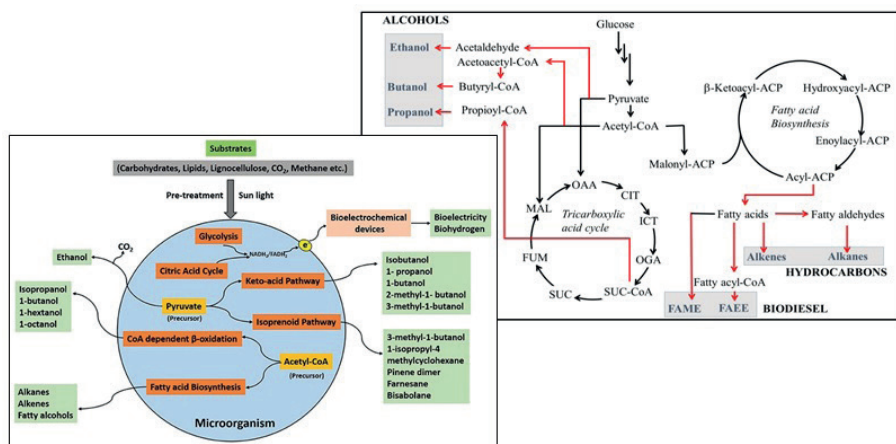


Fig. 9 Vie metaboliche di sintesi di alcoli a catena corta e media e produzione di idrocarburi in una cellula batterica ingegnerizzata. Il glucosio viene metabolizzato ad acetil-CoA, un precursore del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e delle vie biosintetiche degli acidi grassi. Gli alcoli a catena corta (etanolo, propanolo, butanolo) sono prodotti a partire da acetil-CoA attraverso il TCA. Gli alcoli grassi, gli esteri etilici degli acidi grassi e gli n-alcani sono prodotti utilizzando i trasportatori (acyl-ACP, Acyl Carrier Proteins) del macchinario biosintetico degli acidi grassi (schema a sinistra, da: Kumar and Kumar, 2017; schema a destra, da: Rahman et al., 2018)

Ancora per fornire un riferimento circa la tendenza nei Paesi più industrializzati, vale la pena considerare che i biocarburanti costituiscono attualmente circa il 12% del carburante per il trasporto su strada nei soli Stati Uniti. Di fatto, il bioetanolo e il biodiesel rappresentano la grande maggioranza del consumo di biocarburanti negli USA. Già nel corso di questi primi anni 2020 e poi a seguire, si prevede una produzione di biocarburanti di 2^a generazione in

rapida crescita, di pari passo con la disponibilità di nuovi substrati e di nuove vie metaboliche rese possibili dallo sviluppo delle biotecnologie (fig. 10).

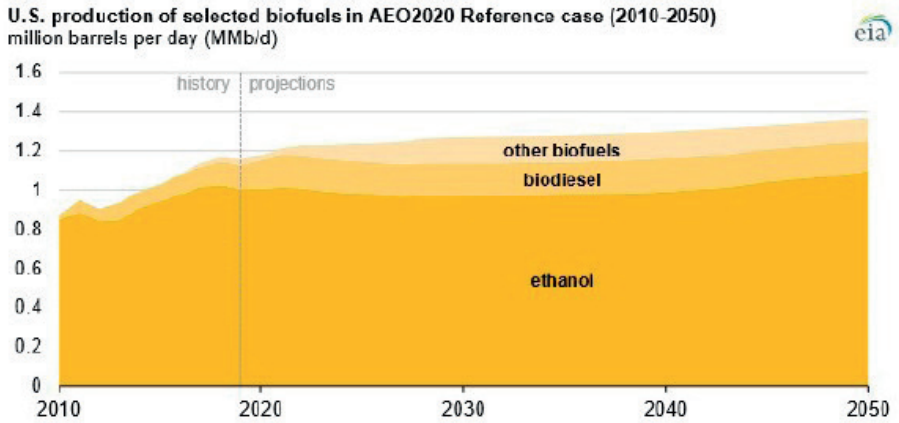


Fig. 10 *Stima dei volumi della produzione USA per tipo di biocarburante nel periodo 2010-2050 (fonte: US Energy Information Administration)*

È inoltre interessante sottolineare come le emissioni di gas serra non sono l'unica forma di inquinamento atmosferico che può esser ridotta con l'uso dei biocarburanti. Le emissioni di inquinanti di riferimento (i cosiddetti CAC, *Criteria Air Contaminants*) quali monossido di carbonio, particolato e anidride solforosa hanno un impatto diretto sulla salute umana. La combustione di biocarburanti comunemente impiegati in miscela o in forma non miscelata riduce il rilascio di molti di questi inquinanti (seppur non di tutti!) derivanti in gran quantità invece dalla combustione dei combustibili di origine petrolifera.

CATTURA, UTILIZZO E STOCCAGGIO DEL CARBONIO SIA DI ORIGINE BIOLOGICA CHE FOSSILE

Tutte le forme di biomassa che derivano dallo sfruttamento della fotosintesi catturano l'anidride carbonica atmosferica e la convertono in composti organici. Il contenuto di carbonio di questa biomassa rimane sequestrato fino a quando queste matrici non vanno incontro a mineralizzazione - in gran parte attraverso processi ossidativi - con rilascio di CO_2 in atmosfera. In particolare, è attraverso la combustione che la biomassa - sia nella sua forma nativa che a seguito di conversione in biocombustibile - rilascia il suo contenuto di carbonio sotto forma di anidride carbonica. Sebbene possa

considerarsi a bilancio di carbonio neutro (*carbon neutral*), nel senso che il carbonio biogenico rilasciato corrisponde a quello catturato precedentemente dall'atmosfera durante la stagione di formazione della biomassa, la combustione tradizionale non prevede il sequestro e l'utilizzo del carbonio prima che nuova biomassa si sia a sua volta generata. Oggi – in ragione del contrasto al riscaldamento globale – si guarda con crescente interesse alle tecnologie di cattura e stoccaggio del carbonio (CCS, *Carbon Capture and Sequestration/Storage*). Queste tecnologie consentono di intercettare le emissioni di anidride carbonica da impianti industriali a elevato rilascio di CO_2 , quali centrali termo-elettriche e inceneritori di rifiuti o strutture impiantistiche energivore come cementifici e impianti siderurgici, e di immagazzinarle nel sottosuolo (fig. 11).

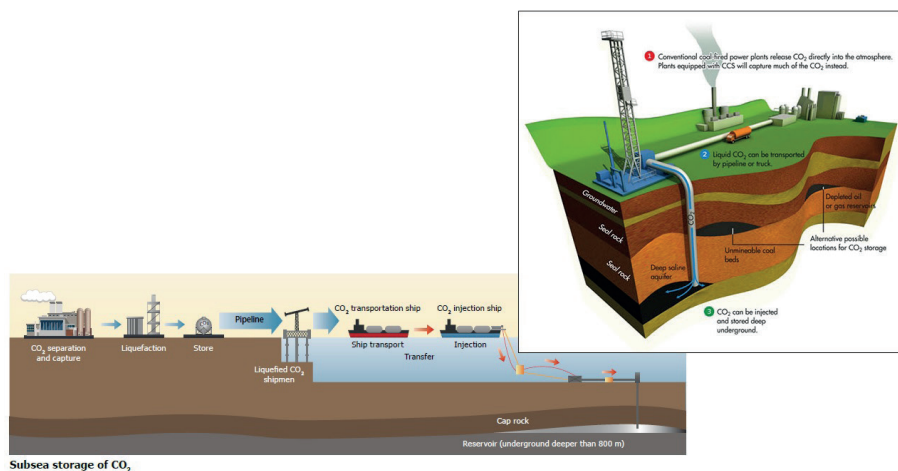


Fig. 11 *Rappresentazione grafica delle procedure di cattura e confinamento della CO_2 nel sottosuolo o al disotto dei fondali marini (fonte: Japanese Ministry of the Environment)*

Attraverso le tecnologie CCS è possibile ridurre significativamente la CO_2 rilasciata in atmosfera. L'applicazione, ad esempio, del principio CCS a una centrale a carbone con una potenza di 800 MW, in grado di fornire energia a circa 270mila famiglie, può evitare circa 3,4 milioni di tonnellate di emissioni di CO_2 su base annua. Tuttavia, le tecnologie CCS – basate su processi fisico-chimici – ad oggi considerate sono sistemi a elevata intensità energetica. Attualmente, circa il 30% del carbonio catturato viene infatti bilanciato dalla combustione di matrici fossili necessaria per separare, comprimere, trasportare e iniettare nel sottosuolo il carbonio intercettato.

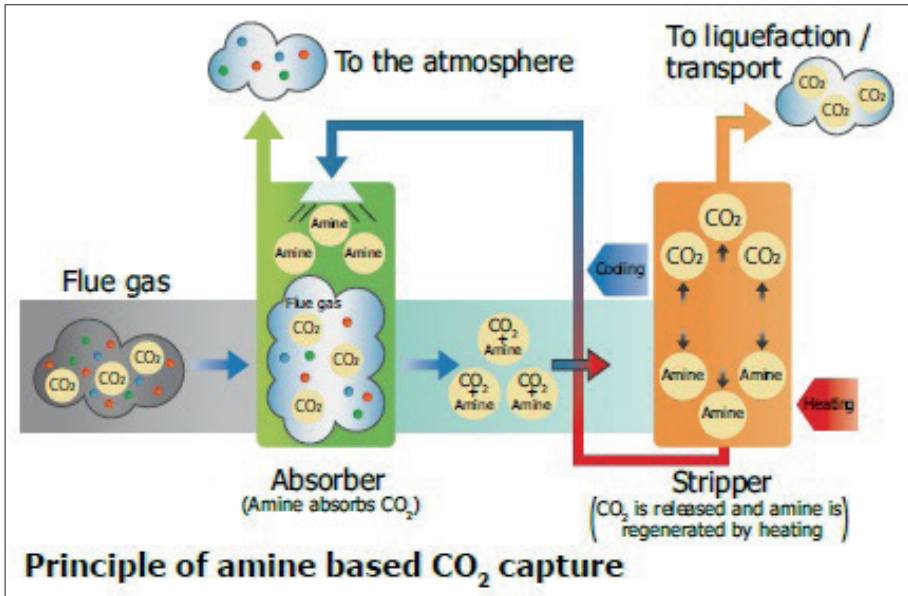


Fig. 12 Cattura della CO₂ da gas di combustione mediante assorbimento su colonne caricate con mono-etanol-ammina (fonte: Japanese Ministry of the Environment)

Per la cattura dell'anidride carbonica si ricorre oggi diffusamente a colonne di assorbimento caricate con mono-etanol-ammina (MEA), una sostanza chimica in grado di trattenere una grande quantità di CO₂ altamente pura dai gas di combustione delle centrali termoelettriche o di altri impianti. Consentendo a un flusso di gas di combustione di entrare in contatto con la soluzione di ammina, avviene l'assorbimento dell'anidride carbonica. Riscaldando poi questa soluzione contenente CO₂ a circa 120°C, l'ammina e la CO₂ vengono separate l'una dall'altra e la CO₂ può essere così compressa e liquefatta (fig. 12).

Per rendere quantomeno più economicamente efficaci i sistemi CCS, oggi si guarda con interesse alla possibilità di utilizzare la CO₂ da processi di combustione come risorsa, convertendola in intermedi chimici per molte filiere industriali di sintesi o sfruttandola per un utilizzo diretto. Tuttavia, poiché la conversione della CO₂ nelle suddette sostanze chimiche – via *syngas* (acronimo per *synthesis gas*) – richiede energia, l'orientamento è quello di ricorrere a metodi che non utilizzino combustibili fossili quanto piuttosto fonti di energia rinnovabile. D'altra parte, esempi di utilizzo diretto della CO₂ includono il recupero avanzato del petrolio (*Enhanced Oil Recovery*, EOR) che prevede l'iniezione di anidride carbonica nei giacimenti petroliferi in fase di sfruttamento avanzato per facilitare il recupero del greggio (fig. 13).

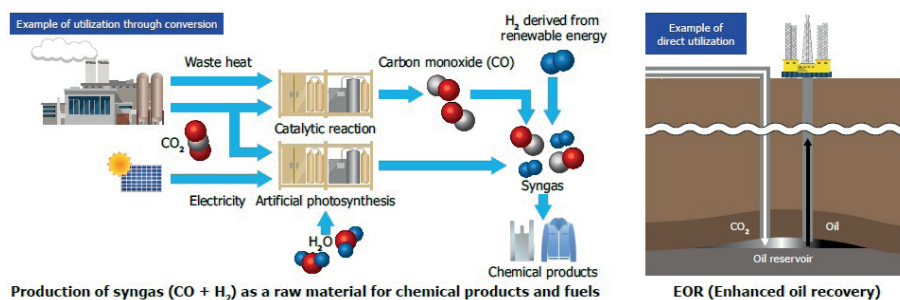


Fig. 13 *Filiere CCUS (Carbon Capture, Utilisation and Storage) per la valorizzazione della CO₂ catturata, basate su tecnologie di tipo fisico-chimico (fonte: Japanese Ministry of the Environment)*

Laddove invece si produce energia da biomassa vegetale, la matrice ligno-cellulosica che si è generata attraverso l'assorbimento di CO₂ dall'atmosfera viene utilizzata come combustibile. Se l'anidride carbonica che si libera dalla combustione (già di per sé a impatto neutro) viene catturata e immagazzinata nel sottosuolo secondo la tecnologia CCS, alla fine il bilancio dell'emissione di CO₂ nell'aria può risultare negativo in quanto porta a una riduzione netta del contenuto di anidride carbonica in atmosfera.

Questa combinazione viene indicata con l'acronimo BECCS (*Biomass Energy* [o Bio-Energy] *with CCS*) ed è presa in considerazione come tecnologia chiave per giungere – nel breve-medio termine – a emissioni zero nei casi in cui sia disponibile biomassa ai fini della produzione di energia elettrica (fig. 14).

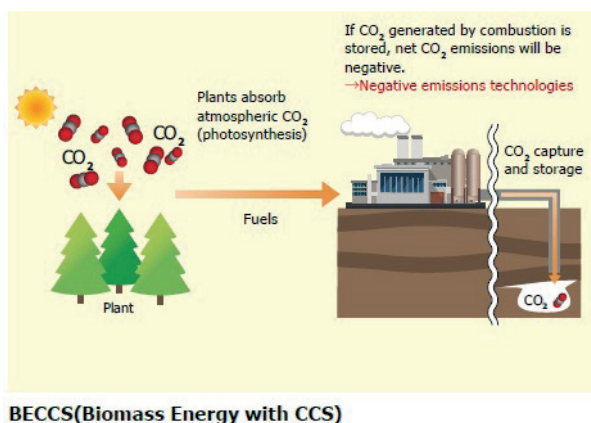


Fig. 14 *Rappresentazione schematica della filiera BECCS basata sull'utilizzo di biomassa vegetale come combustibile per la generazione di energia elettrica (fonte: Japanese Ministry of the Environment)*

Ma torniamo a considerare i processi basati sulla catalisi microbica in grado di trasformare in intermedi chimici di interesse economico la CO_2 e altri composti gassosi contenenti carbonio derivanti dall'utilizzo a fini energetici di matrici carboniose, sia di origine vegetale sia fossile, oltre che dalla termovalorizzazione dei rifiuti solidi urbani. Il riferimento è al già citato *syngas* che si genera a seguito del processo di gasificazione della biomassa ligno-cellulosica o di altre matrici energetiche.

La gasificazione è di fatto il processo di trattamento termico di materiali carboniosi a temperature intorno ai $700\text{ }^\circ\text{C}$, in presenza di modeste concentrazioni di ossigeno che escludono la completa combustione. A seguito di questo trattamento, la matrice carboniosa genera una miscela gassosa contenente – in prevalenza – CO , CO_2 e H_2 . Quest'ultimi gas – una volta liberati da impurezze quali CH_4 , C_2H_2 , C_2H_4 , H_2S , NH_3 , carbonil solfuro (COS), acido cianidrico (HCN) e ossido nitrico – possono essere convertiti da batteri acetogenici in biocarburanti e altre sostanze chimiche. La fermentazione del *syngas* è perciò un processo di bio-conversione indiretta del substrato di partenza. A differenza dei processi di idrolisi/fermentazione, la fermentazione a carico del *syngas* è infatti un processo di fermentazione indiretta dal momento che le matrici carboniose di partenza non vengono alimentate direttamente nel bioreattore per generare i prodotti della catalisi microbica. I substrati carboniosi devono esser prima gasificati a formare il *syngas*, il quale viene poi purificato da eventuale sostanze indesiderate e raffreddato prima di essere immesso nel fermentatore.

In condizioni anaerobiche, batteri acetogenici come *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium carboxidivorans*, *Alkalibaculum bacchi* e *Clostridium ragdalei* fungono da biocatalizzatori (Phillips et al., 1994; Liou et al., 2005; Wilkins & Atiyeh, 2011; Liu et al., 2012;). Nella fermentazione del *syngas*, i batteri acetogenici metabolizzano CO , CO_2 e H_2 in alcoli e acidi organici. Le reazioni biochimiche complessive per convertire il *syngas* in etanolo e acido acetico sono mostrate di seguito (fig. 15).

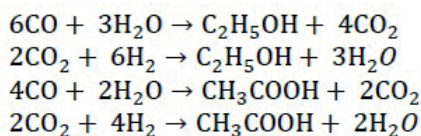


Fig. 15 Reazioni biochimiche complessive di conversione del *syngas* in etanolo e acido acetico (da: Klasson et al., 1990; Vega et al., 1990)

Di fatto, il monossido di carbonio (CO) può essere metabolizzato anaerobicamente da un ampio novero di microrganismi: fotosintetici, acetogenici,

carbossidotrofi e metanogeni per produrre idrogeno, metano, acetato, butirrato, etanolo e butanolo come prodotti finali (Mörsdorf et al., 1992; Abrini et al., 1994). Tuttavia, nell'ambito dei diversi microrganismi anaerobi, i batteri acetogenici risultano – come già accennato – di primaria importanza per la capacità di crescere chemolitotroficamente (cioè, di utilizzare composti inorganici ridotti come fonte di energia) e produrre etanolo e butanolo insieme ad acetato e butirrato a partire da CO , CO_2 , H_2 , formiato e metanolo (Mohammadi et al., 2011).

I batteri acetogenici metabolizzano composti a singolo atomo di carbonio attraverso la via dell'acetil-CoA, detta anche via Wood-Ljungdahl, che consente a questi microrganismi di (i) sintetizzare la parte acetilica dell'acetil-CoA a partire dalla CO_2 , (ii) risparmiare energia, (iii) assimilare la CO_2 come carbonio cellulare (Ljungdahl, 1986; Wood et al., 1986). L'acetil-CoA è negli acetogenici perciò un importante intermedio metabolico che può essere utilizzato per produrre etanolo, butanolo, esanolo, acetato, butirrato, esanoato e biomassa cellulare (Phillips et al., 2015).

La via di Wood-Ljungdahl è un percorso lineare e riduttivo a differenza dei processi ciclici di fissazione della CO_2 come il ciclo di Calvin-Benson e quello degli acidi tricarbossilici (Madigan et al., 2003). I batteri acetogenici non possono utilizzare il ciclo di Calvin-Benson – che è invece impiegato dagli autotrofi fotosintetici e chemiosintetici – perché mancano dell'enzima ribuloso difosfato carbossilasi (RuBisCO) (Wood et al., 1986). Si ritiene che la via di Wood-Ljungdahl possa funzionare in direzione sia dell'ossidazione che della riduzione. La conversione della CO_2 in acetato è un processo di riduzione. Tuttavia, l'acetato può essere riconvertito in CO_2 a seguito di ossidazione (Ragsdale, 1997). I batteri acetogenici conservano l'energia riducendo CO e/o CO_2 e H_2 ad acetato. Nella via Wood-Ljungdahl, la sintesi dell'acetil-CoA avviene attraverso due rami, il ramo del gruppo metile e il ramo del gruppo carbonile (fig. 16).

Uno schema di processo ibrido di gassificazione-fermentazione del *syngas* è riportato in figura 17. Come già accennato, il processo di conversione ibrida prevede la gassificazione del substrato carbonioso di partenza (biomassa vegetale o altra matrice carboniosa), seguita dalla fermentazione e – in questo caso – dalla purificazione finale di bioetanolo. In alcuni casi, i gas di scarico generati da certi processi industriali possono essere immessi direttamente nel fermentatore.

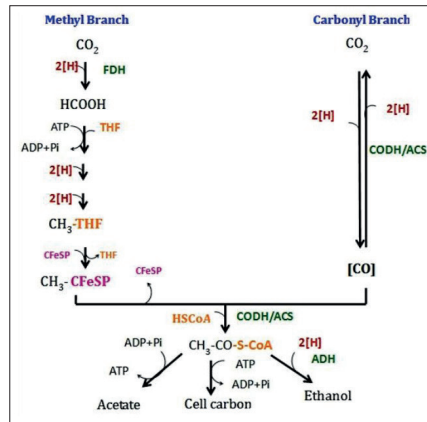


Fig. 16 Schema della via di Wood-Ljungdahl. FDH, CODH/ACS e ADH sono gli enzimi, THF, HSCoA e $\text{CH}_3\text{-CO-S-CoA}$ sono i co-enzimi, mentre CFeSP è la proteina corrinoidale, tutte componenti coinvolte nella via metabolica. LEGENDA: FDH = formiato deidrogenasi; CODH/ACS = monossido di carbonio deidrogenasi/acetil-CoA sintasi bifunzionale; ADH = alcol deidrogenasi; CFeSP = proteina corrinoidale ferro(Fe)-zolfo(S); THF = tetraidrofolato (vitamina B9, derivato dell'acido folico); HSCoA = gruppo funzionale tiolo (SH) Coenzima A; $\text{CH}_3\text{-CO-S-CoA}$ = acetil-coenzima A (modificato da: Drake & Daniel, 2004)

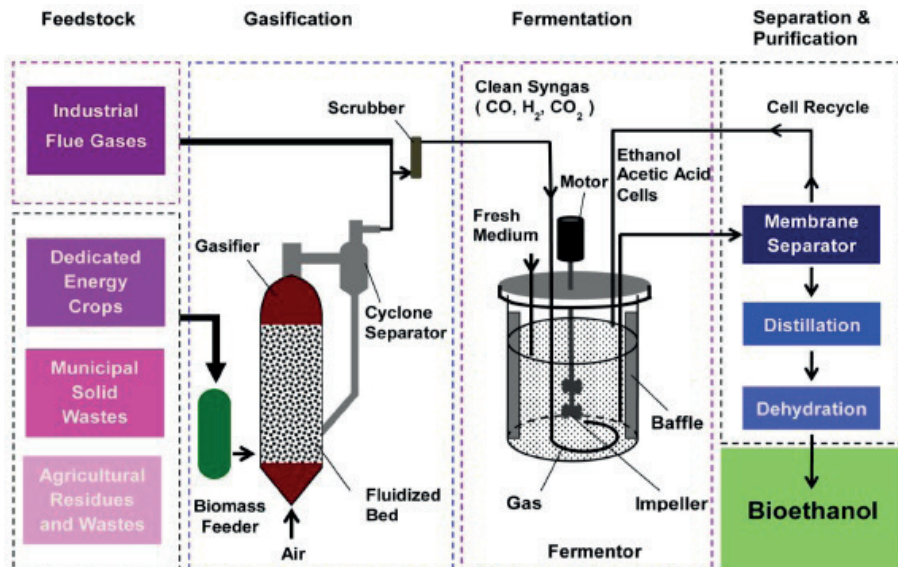


Fig. 17 Schematizzazione del processo ibrido di gasificazione seguita da fermentazione del syngas con produzione di etanolo ed acido acetico a partire da una ampia gamma di substrati carboniosi (da: Devarapalli and Atiyeh, 2015)

A fronte di tutto quanto sin qui detto, è necessario comunque evidenziare l'esistenza di limiti oggettivi alla fermentazione del *syngas*; questi limiti sono rappresentati (i) dalla scarsa solubilità e dal basso tasso di trasferimento dei substrati gassosi – soprattutto CO e H₂ – in mezzo liquido, (ii) dalla lentezza delle reazioni con conseguente necessità di tempi lunghi di ritenzione in fermentatore, (iii) dalla modesta energia metabolica generata dai microrganismi cresciuti sul substrato gassoso rispetto alla crescita su substrati zuccherini con conseguente sviluppo rallentato e quindi bassa densità cellulare e ridotta produzione solventogenica (Barik et al., 1988; Vega et al., 1989).

D'altra parte, sempre attraverso sistemi biotecnologici di cattura e utilizzazione del carbonio (CCU, *Carbon Capture and Utilization*), alghe e batteri possono essere messi in grado di utilizzare la CO₂, contenuta nelle emissioni gassose in uscita da processi di combustione, per mezzo della fotosintesi, eliminando in molti casi le procedure – energeticamente dispendiose – per la purificazione preventiva dei flussi gassosi destinati alla sintesi chimica o biologica di intermedi a elevato valore aggiunto. I sistemi microbici basati sull'impiego di specie fotosintetiche possono funzionare in modo efficiente anche a concentrazioni di CO₂ relativamente basse come quelle che ricorrono nei gas di scarico delle centrali termo-elettriche a gas naturale o altro combustibile fossile. Possono così essere impiegati economicamente anche su scala relativamente piccola per far fronte alle emissioni di strutture industriali non in grado di sostenere sistemi CCS tradizionali.

Le microalghe quali *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* e altre specie di questo genere, *Chlorococcum littorale*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus* e altre specie di questo genere, *Monoraphidium minutum* e *Tetraselmis* sp. ovvero batteri fotosintetici ossigenici quali i cianobatteri del genere *Spirulina* sp. (in particolare *Spirulina platensis*, oggi *Arthrospira platensis*) sono microrganismi comunemente impiegati per la mitigazione delle emissioni di CO₂ (Ho et al., 2011; Lam et al., 2012; Kumar et al., 2014).

Di fatto, soprattutto i sistemi basati sullo sfruttamento di microalghe sono un'alternativa sostenibile poiché possono produrre un'ampia gamma di materie prime per la produzione di biodiesel, bioetanolo, biometano e bioidrogeno. Il principale vantaggio offerto dall'olio estratto da microalghe, rispetto agli oli vegetali è dato dal fatto che può esser ottenuto da "coltivazioni" su terreni per così dire non arabili (Patil et al., 2008; Schenk et al., 2008; Singh et al., 2014). Inoltre, le microalghe possono costituire promettenti biorisorse anche per la messa a punto di mangimi per uso zootecnico, prodotti farmaceutici e altri prodotti di alto valore (Sansawa & Endo, 2004). Tuttavia, nonostante i vantaggi dell'olio estraibile da microalghe come materia prima per biocarburanti, sussistono diversi vincoli che devono ancora essere superati per

poter renderlo un'alternativa economicamente sostenibile per la produzione di bioenergia. La produzione di microalghe nei fotobioreattori è infatti un processo complesso che deve ancora essere perfezionato.

Oltre alle condizioni di coltura, la specie di microalga di volta in volta prescelta è importante in quanto si riflette direttamente sull'efficienza della fotosintesi e, quindi, sulle prestazioni di fissazione del carbonio e produzione di biomassa. La selezione, l'isolamento e la coltura di specie di microalghe con un elevato tasso di crescita, un alto tasso di fotosintesi, una forte tolleranza/adattabilità ambientale e un elevato contenuto lipidico richiedono ancora sforzi nell'ambito di progetti di ricerca e sviluppo. Fondamentale sarà l'individuazione di specie microalgali "ideali" per la cattura di CO_2 , in grado di crescere in un'ampia gamma di condizioni di temperatura e di concentrazione di CO_2 . La fissazione di CO_2 da parte delle microalghe è un processo complesso, soprattutto in un ambiente caratterizzato da gas di scarico. Di solito, la maggior parte dei parametri fisico-chimici e idrodinamici di processo hanno importanti effetti non lineari sulla crescita delle microalghe. Nodale è perciò il pieno chiarimento del reale impatto di questi fattori sull'attività dell'enzima anidrasi carbonica e sui meccanismi di concentrazione del carbonio (Zhao and Su, 2014). Questi parametri sono correlati e interagiscono tra loro. Non è possibile prescindere dal considerare in modo integrato gli effetti derivanti da tutti i fattori di processo per migliorare la crescita delle microalghe e la tolleranza di queste all'ambiente di coltura.

La crescita delle microalghe può attuarsi per via fotoautotrofa o eterotrofa. Alcuni ceppi di alghe possono combinare il processo autotrofo di fotosintesi con l'assimilazione eterotrofica di composti organici in quello che viene definito metabolismo mixotrofo. Attualmente, la produzione fotoautotrofa è l'unico metodo tecnicamente ed economicamente sostenibile per la produzione su larga scala di microalghe.

Due sono le tipologie di sistemi per la coltivazione di microalghe che sono stati sin qui implementati su scala tecnologica: i sistemi in vasche aperte e un'ampia gamma di foto-bioreattori chiusi. Queste due tipologie di sistemi sono ben documentate in letteratura (Acien et al., 2017; Zhou et al., 2020) (fig. 18).

L'uso delle microalghe al fine di mitigare le emissioni di CO_2 sta suscitando un crescente interesse nell'ambito della ricerca e, soprattutto, in vista della messa a punto di soluzioni impiantistiche affidabili e sostenibili dal punto di vista economico, al netto di applicazioni già in essere a livello prototipale. L'ultima frontiera degli studi in questo settore guarda inoltre all'applicazione della tecnologia delle microalghe non solo per la rimozione della CO_2 ma anche per la riduzione delle concentrazioni di NO_x e SO_x presenti nei gas industriali

di scarico. Questa prospettiva sembra essere molto efficace e rappresentare un approccio potenzialmente economico ed ecologicamente sostenibile per la risoluzione dei problemi associati alle emissioni di CO_2 e all'inquinamento atmosferico causato da una vasta gamma di processi industriali. In aggiunta alla mitigazione della CO_2 e alla contemporanea rimozione di NO_x e SO_x , la biomassa microalgale mostra anche elevate capacità di legare i metalli, rendendo l'abbattimento dei metalli pesanti nei gas di combustione per mezzo delle alghe una potenziale applicazione (Yen et al., 2015).



Fig. 18 *Tipologie disponibili di foto-bioreattori per la cattura di CO_2 da emissioni industriali*

In conclusione, l'utilizzo dei gas di combustione per coltivare microalghe si presenta come un percorso promettente per la produzione di utile biomassa finalizzata alla trasformazione in biocarburanti e altri prodotti di interesse industriale contestualmente a un valido contrasto al rilascio di emissioni gassose inquinanti e climalteranti (fig. 19).

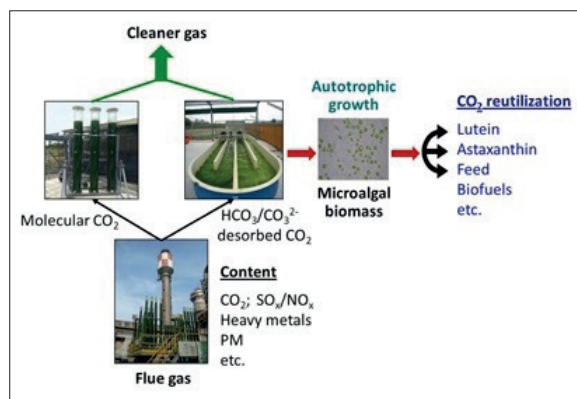


Fig. 19 *L'uso di microalghe per la cattura della CO₂ contenuta nei gas di scarico di derivazione industriale associata a simultanea rimozione di NO_x e SO_x rappresenta un approccio con interessanti risvolti sia dal punto di vista economico che da quello ambientale per mitigare le emissioni climalteranti e ridurre l'inquinamento dell'aria (da: Yen et al., 2015)*

RIASSUNTO

Le biotecnologie sono tecnologie basate sullo sfruttamento di processi promossi da catalizzatori biologici. Le applicazioni delle biotecnologie investono la maggior parte degli aspetti della vita contemporanea, dall'agricoltura a filiere produttive le più svariate, fino al settore medico. Nell'ambito del cambiamento climatico, le biotecnologie microbiche offrono – nello specifico – soluzioni sul fronte di quattro aree tematiche chiave: [1] Produzione sostenibile di materie prime da biomassa, [2] Rafforzamento delle filiere sostenibili di produzione di beni e servizi, [3] Sviluppo di prodotti a bassa impronta ambientale anche in termini di emissioni di carbonio, [4] Contributo al sequestro del carbonio. Le biotecnologie forniscono di fatto un aiuto importante alla riduzione a breve termine dei gas serra e rappresentano strumenti affatto rivoluzionari per combattere il cambiamento climatico a lungo termine. Questa presentazione esamina gli attuali contributi delle biotecnologie microbiche alla riduzione dei gas climalteranti e identifica le soluzioni biotecnologiche emergenti dotate di maggiore potenziale per evitare e invertire il catastrofico cambiamento climatico. Viene affrontata l'analisi delle quattro aree tematiche sopra citate. Particolare attenzione è data però a come le biotecnologie possono svolgere un ruolo aggiuntivo chiave per mezzo di soluzioni CCS (*Carbon Capture and Storage*) più scalabili, affidabili e convenienti, a fronte dell'attuale dispiegamento di protocolli per la cattura e il sequestro del carbonio mediante confinamento geologico della CO₂.

ABSTRACT

Contribution of microbial biotechnologies in response to climate change: bioprocesses for decarbonization and renewable energy production. Biotechnologies are technologies based on the exploitation of processes promoted by biological catalysts. The applications of biotechnologies involve most of the aspects of modern life, from agriculture to a number of different production chains, up to the healthcare industry. In the context of climate change, microbial biotechnologies offer - specifically - solutions on the front of four key thematic areas: [1] Sustainable production of raw materials from biomass, [2] Strengthening of sustainable production chains for goods and services, [3] Development of innovative products with a low environmental footprint also in terms of carbon emissions, [4] Contribution to carbon sequestration. Actually, biotechnologies provide an important contribution to near-term reduction of greenhouse gases and represent a quite revolutionary tool to combat climate change in the longer term. This presentation examines the current contributions of microbial biotechnologies to the reduction of greenhouse gases and identifies emerging biotechnological solutions with the greatest potential for avoiding and reversing catastrophic climate change. Here the analysis of the four thematic areas mentioned above is dealt with. However, particular focus is given to how biotechnologies can play a key additional role by means of more scalable, reliable and cost-effective CCS (Carbon Capture and Storage) solutions, compared with the current deployment of protocols for carbon capture and sequestration through geological confinement of CO₂.

BIBLIOGRAFIA

- ABRINI J., NAVEAU H., NYNS E.J. (1994): *Clostridium autoethanogenum*, *sp. nov.*, an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide, «Arch. Microbiol.», 161 (4), pp. 345-351. <https://doi.org/10.1007/BF00303591>
- ACIÉN F.G., MOLINA E., REIS A., TORZILLO G., ZITTELLI G.C., SEPÚLVEDA C., MASOJÍDE J. (2017): *1. Photobioreactors for the production of microalgae*, in *Woodhead Publishing Series in Energy - Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, Cristina Gonzalez-Fernandez and Raúl Muñoz Eds, Woodhead Publishing, pp. 1-44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00001-7>
- BAK S., PRIETO S., HARRISON S., CLAUSEN E., GADDY J. (1988): *Biological production of alcohols from coal through indirect liquefaction*, «Appl. Biochem. Biotechnol.», 18 (1), pp. 363-378. <https://doi.org/10.1007/BF02930840>
- BECERRA M., Cerdán M.E., GONZÁLEZ-SISO M.I. (2015): *Biobutanol from cheese whey*, «Microbial Cell Factories», 14, 27. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0200-1>
- CARBON TRUST (2022): *Product carbon footprint labelling*. <https://www.carbontrust.com/search/demand%20for%20climate%20change%20labelling>
- DEVARAPALLI M., ATTYEH H.K. (2015): *A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation*, «Biofuel Research Journal», 2 (3), pp. 268-280. <https://doi.org/10.18331/BRJ2015.2.3.5>
- DRAKE H.L., DANIEL S.L. (2004): *Physiology of the thermophilic acetogen Moorella thermoacetica*, «Res. Microbiol.», 155 (10), pp. 869-883. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.10.002>

- EIA (U.S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION) (2021): *Petroleum & Other Liquids – U.S. Product Supplied of Crude Oil and Petroleum Products*. <https://www.eia.gov/dnav/pet/hist/LeafHandler.ashx?n=PET&s=MTTUPUS1&f=A>
- EPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) (2017): *Renewable Fuel Standard Program – Standards for 2018 and Biomass-Based Diesel Volume for 2019: Response to Comments*. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi?Dockey=P100TDDH.pdf>
- EPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) (2021): *Greenhouse Gas Inventory Data Explorer*. <https://cfpub.epa.gov/ghgdata/inventoryexplorer/>
- HAMELINCK C.N., HOOIJDONK G.V., FAIJ A.P.C. (2005): *Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term*, «Biomass Bioenergy», 28 (4), pp. 384-410. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.09.002>
- HO S.-H., CHEN C.-Y., LEE D.-J., CHANG J.-S. (2011): *Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems. A review*, «Biotechnology Advances», 29 (2), pp. 189-198. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.001>
- HOBDEN R. (2014): *Commercializing Enzymatic Biodiesel Production*, «Biodiesel Magazine», 3 January 2014. <http://www.biodieselmagazine.com/articles/9481/commercializing-enzymatic-biodiesel-production>
- KANG M.-K., NIELSEN J. (2017): *Biobased production of alkanes and alkenes through metabolic engineering of microorganisms*, «J. Ind. Microbiol. Biotechnol.», 44 (4), pp. 613-622. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1814-y>
- KLASSON K., ELMORE B., VEGA J., ACKERSON M., CLAUSEN E., GADDY J. (1990): *Biological production of liquid and gaseous fuels from synthesis gas*, «Appl. Biochem. Biotechnol.», 24 (1), pp. 857-873. <https://doi.org/10.1007/BF02920300>
- KUMAR K., BANERJEE D., DAS D. (2014): *Carbon dioxide sequestration from industrial flue gas by Chlorella sorokiniana*, «Bioresource Technology», 152, pp. 225-233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.098>
- KUMAR R., KUMAR P. (2017): *Future Microbial Applications for Bioenergy Production: A Perspective*, «Front. Microbiol.», 8, 450. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00450>
- LAM M.K., LEE K.T., MOHAMED A.R. (2012): *Current status and challenges on microalgae-based carbon capture*, «International Journal of Greenhouse Gas Control», 10, pp. 456-469. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2012.07.010>
- LELIEVELD J., KLINGMÜLLER K., POZZER A., BURNETT R.T., HAINES A., RAMANATHAN V. (2019): *Effects of fossil fuel and total anthropogenic emission removal on public health and climate*, «PNAS», 116 (15), pp. 7192-7197. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819989116>
- LIU J.S.C., BALKWILL D.L., DRAKE G.R., TANNER R.S. (2005): *Clostridium carboxidivorans sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen Clostridium scatologenes strain SL1 as Clostridium drakei sp. Nov.*, «Int. J. Syst. Evol. Microbiol.», 55 (5), pp. 2085-2091. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63482-0>
- LIU K., ATIYEH H.K., TANNER R.S., WILKINS M.R., HUHNKE R.L. (2012): *Fermentative production of ethanol from syngas using novel moderately alkaliphilic strains of Alkalibaculum bacchi*, «Bioresour. Technol.», 104, pp. 336-341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.054>
- LJUNGDHAL L. (1986): *The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria*, «Annu. Rev. Microbiol.», 40 (1), pp. 415-450. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.40.100186.002215>

- MADIGAN M., MARTINKO J., PARKER J. (2003): *Brock biology of microorganisms*, Prentice Hall/Pearson Education, New Jersey, USA, pp. 1019.
- MBANEME-SMITH V., CHINN M.S. (2015): *Consolidated bioprocessing for biofuel production: recent advances*, «Energy and Emission Control Technologies», 3, pp. 23-44. <http://dx.doi.org/10.2147/EECT.S63000>
- MOHAMMADI M., NAJAFPOUR G.D., YOUNESI H., LAHIJANI P., UZIR M.H., MOHAMED A.R. (2011): *Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review*, «Renew - Sustainable Energy Rev.», 15 (9), pp. 4255-4273. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.12>
- MÖRSDORF G., FRUNZKE K., GADKARI D., MEYER O. (1992): *Microbial growth on carbon monoxide*, «Biodegradation», 3, pp. 61-82. <https://doi.org/10.1007/BF00189635>
- PATIL V., TRAN K.Q., GISELRØD H.R. (2008): *Towards sustainable production of biofuels from microalgae*, «Int. J. Mol. Sci.», 9, pp. 1188-1195. <https://doi.org/10.3390/ijms9071188>
- PHILLIPS J.R., CLAUSEN E.C., GADDY J.L. (1994): *Synthesis gas as substrate for the biological production of fuels and chemicals*, «Appl. Biochem. Biotechnol.», 45 (1), pp. 145-157. <https://doi.org/10.1007/BF02941794>
- PHILLIPS J.R., ATIYEH H.K., TANNER R.S., TORRES J.R., SAXENA J., WILKINS M.R., HUHNE R.L. (2015): *Butanol and hexanol production in Clostridium carboxidivorans syngas fermentation: Medium development and culture techniques*, «Bioresour. Technol.», 190, pp. 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.043>
- RAGSDALE S.W. (1997): *The eastern and western branches of the Wood/Ljungdahl pathway: How the east and west were won*, «BioFactors», 6 (1), pp. 3-11. <https://doi.org/10.1002/biof.5520060102>
- RAHMAN Z., NAWAB J., SUNG B.H., KIM S.C. (2018): *A Critical Analysis of Bio-Hydrocarbon Production in Bacteria: Current Challenges and Future Directions*, «Energies», 11(10), p. 2663. <https://doi.org/10.3390/en11102663>
- SANSAWA H., ENDO H. (2004): *Production of intracellular phytochemicals in Chlorella under heterotrophic conditions*, «J. Biosci. Bioeng.», 98, pp. 437-444.
- SCHENK P.M., THOMAS-HALL S.R., STEPHENS E., MARX U.C., MUSSGNUG J.H., POSTEN C., KRUSE O., HANKAMER B. (2008): *Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production*, «Bioenergy Res.», 1, pp. 20-43.
- SINGH B., GULDHE A., RAWAT I., BUX F. (2014): *Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae Renew*, «Sustain. Energy Rev.», 29, pp. 216-245. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.08.067>
- SINGH J.K., VYAS P., DUBEY A., PRAKASH UPADHYAYA C., KOTHARI R., TYAGI V.V., KUMAR A. (2018): *Assessment of different pretreatment technologies for efficient bioconversion of lignocellulose to ethanol*, «Front. Biosci.» (Schol. Ed.), 10 (2), pp. 350-371. <https://doi.org/10.2741/S521>
- STATISTA (2021): *Volume of plastic waste generated in the municipal solid waste stream in the U.S. from 1960 to 2018*. <https://www.statista.com/statistics/1097290/us-plastic-waste-generation/>
- THANGARAJ B., SOLOMON P.R., MUNIYANDI B., RANGANATHAN S., LIN L. (2019): *Catalysis in biodiesel production - a review*, «Clean Energy», 3 (1), pp. 2-23. <https://doi.org/10.1093/ce/zky020>
- VEGA J.L., CLAUSEN E.C., GADDY J.L. (1990): *Design of bioreactors for coal synthesis gas fermentations*, «Resour. Conserv. Recycl.», 3 (2-3), pp. 149-160. [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(90\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0921-3449(90)90052-6)

- VEGA J.L., PRIETO S., ELMORE B.B., CLAUSEN E.C., GADDY J.L. (1989): *The biological production of ethanol from synthesis gas*, «Appl. Biochem. Biotechnol.», 20 (1), pp. 781-797. <https://doi.org/10.1007/BF02936525>
- WILKINS M.R., ATIYEH H.K. (2011): *Microbial production of ethanol from carbon monoxide*, «Curr. Opin. Biotechnol.», 22 (3), pp. 326-330. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.03.005>
- WOOD H.G., RAGSDALE S.W., PEZACKA E. (1986): *The acetyl-CoA pathway of autotrophic growth*, «FEMS Microbiol. Lett.», 39 (4), pp. 345-362. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(86\)90022-4](https://doi.org/10.1016/0378-1097(86)90022-4)
- XIN F., DONG W., ZHANG W., MA J., JIANG M. (2019): *Biobutanol Production from Crystalline Cellulose through Consolidated Bioprocessing*, «Trends in Biotechnology», 37 (2), pp. 167-180. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.007>
- YEN H.-W., HO S.-H., CHEN C.-Y., CHANG, J.-S. (2015): *CO₂, NO_x and SO_x removal from flue gas via microalgae cultivation - A critical review*, «Biotechnology Journal», 10, pp. 829-839. <https://doi.org/10.1002/biot.201400707>
- ZHAO B., SU Y. (2014): *Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review*, «Renewable and Sustainable Energy Reviews», 31 (1), pp. 121-132. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.054>
- ZHOU W., LU Q., HAN P., LI J. (2020): *3. Microalgae Cultivation and Photobioreactor Design*, in *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, Ed(s): Abu Yousuf, Academic Press, pp. 31-50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00003-5>

SILVIA LAMPIS¹

I microrganismi nella decontaminazione ambientale: tendenze e limitazioni

¹ Dipartimento di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona

(Sintesi)

La possibilità di sfruttare la capacità dei microorganismi (batteri e funghi) di aggredire e/o biotrasformare composti inquinanti, organici e/o inorganici, di sintesi o di origine naturale, rappresenta un aspetto di grande interesse per quel che riguarda lo sviluppo di prodotti e strategie nell'ambito della decontaminazione ambientale mediante biorisanamento.

È noto difatti come i microrganismi siano abili degradatori di composti idrocarburici sia alifatici che aromatici, capaci di attaccare molecole anche strutturalmente complesse come IPA (Idrocarburi Policiclici Aromatici) ad alto peso molecole e composti idrocarburi alogenati altamente recalcitranti come i PCB (Poli Cloro Bifenili) e le sostanze PFAS (Sostanze Poli e Per-Fluoro Alchiliche), contaminanti emergenti di grande impatto sulla salute degli ecosistemi.

Per quanto riguarda l'abilità degradativa dei microrganismi, è noto come non esistano composti organici naturali che siano totalmente resistenti alla biodegradazione posto che le condizioni ambientali siano favorevoli. Si parla in questo caso del principio di infallibilità microbica (Gale, 1952).

Gli organismi microbici, primi colonizzatori del nostro pianeta, hanno avuto 3,8 miliardi di anni per sviluppare processi metabolici adatti a ricavare energia e carbonio da ogni molecola organica presente in natura. La degradazione microbica può avvenire perché i microrganismi traggono energia e carbonio per le biosintesi dai contaminanti organici oggetto della degradazione oppure perché producono enzimi che oltre a consentire l'utilizzazione dei comuni substrati di crescita possono trasformare/degradare i composti inquinanti attraverso processi di cometabolismo. Le reazioni di degradazione dei composti organici avvengono a velocità maggiori in condizioni di aerobiosi grazie all'azione di enzimi ossidativi come mono- e di- ossigenasi, perossi-

dasi e laccasi. Tuttavia, alcune degradazioni possono avvenire con successo anche in condizioni di anaerobiosi, anche se le velocità di degradazione sono in genere ridotte. È interessante notare come la degradazione di composti quali gli idrocarburi alogenati e alcuni composti aromatici azotati risulti più veloce e completa quando avviene in condizioni di anaerobiosi piuttosto che di aerobiosi. È questo il caso, ad esempio, della dechlorurazione riduttiva del percloro etilene (PCE). Il PCE può essere utilizzato da alcuni batteri quali *Dehalobacter restrictus* o *Dehalococcoides* sp. come accettore finale di elettroni nella respirazione anaerobica attraverso il meccanismo della dechlorurazione riduttiva (Mc Carthy, 1997).

Anche nel caso delle sostanze Per e Poli Fluoro Alchiliche (PFAS), sostanze biologicamente attive di origine antropica, altamente recalcitranti e tossiche per gli ecosistemi, costituite da catene di carbonio e fluoro di lunghezza variabile (tipicamente C_4 - C_{16}) e caratterizzate da stabilità chimica e termica, idro- e oleo-repellenza, è stata dimostrata l'abilità degradativa di alcune specie microbiche (Berhanu et al., 2023). Alcuni batteri si sono dimostrati in grado di degradare PFAS a catena lunga, quali PFOA (Acido Per Fluoro Ottanoico) e PFOS (Acido Per Fluoro Ottan Solfonico), determinando la produzione di PFAS a catena corta, che possiedono potenzialità di adsorbimento e bioaccumulo inferiori. Tra questi sono stati isolati ceppi appartenenti al genere *Pseudomonas* e alle specie *Pseudomonas parafulva* (Yi et al., 2016), e *P. plecoglossicida* (Chetverikov et al., 2017) capaci di degradare lo scheletro carbonioso di PFOA e PFOS in condizioni di aerobiosi. *Acidimicrobium* sp. A6 (Huang and Jaffè, 2019), un batterio autotrofo che ossida l'ammonio a nitrito mentre riduce il ferro ferrico, se esposto a PFOA e PFOS è risultato in grado di rilasciare nel mezzo ioni fluoruro, PFAS a catena corta e acetato. Anche l'incubazione di questo ceppo in presenza di H_2 come unico donatore di elettroni risulta nella defluorinazione di queste sostanze PFAS.

Al tempo stesso la capacità di biotrasformare i metalli pesanti e metalloidi tossici presenti nell'ambiente, li rende potenzialmente utilizzabili in strategie integrate con specie vegetali per la rimozione di tali inquinanti dalle matrici.

Tuttavia, la grande potenzialità intrinseca al metabolismo microbico deve coniugarsi con l'applicabilità nei diversi contesti tenendo conto delle limitazioni legate all'utilizzo dei microorganismi in pieno campo e alla corretta modalità di sfruttamento delle loro capacità metaboliche mediante strategie di biostimolazione o biomagnificazione.

Microorganism for bioremediation in the environment: trends and limitations. *The possibility to exploit the extraordinary ability of microorganisms (both*

bacteria and fungi) to degrade and/or biotransform different pollutants, either organic or inorganic, of natural origin or xenobiotics, is of great relevance for the development of protocols and products for bioremediation.

It is well known that microorganisms can efficiently degrade hydrocarbon compounds, both aliphatic and aromatic, and are capable of degrading complex molecules such as PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), and either many halogenated compounds such as the highly recalcitrant PCBs (Polychlorinated Biphenyl) and PFAS (Per- and PolyFluoroAlkyl Substances).

At the same time, the microbial ability to biotransform toxic heavy metals and metalloids in the environment, makes them potentially useful in integrated protocols with plant species for the removal of these contaminants from polluted matrices. Nevertheless, the great catabolic potential of microorganisms requires the development of appropriate strategies that consider limitations due to their application in field as well as the correct manner of exploitation through either biostimulation or bioaugmentation approaches.

BIBLIOGRAPHY

- BERHANU A., MUTANDA I., TAOLIN J., QARIA M.A., YANG B., ZHU D. (2023): *A review of microbial degradation of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): Biotransformation routes and enzymes*, «Science of The Total Environment», 859, 160010, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160010>.
- CHETVERIKOV S.P., SHARIPOV D.A., KORSHUNOVA T.Y. ET AL. (2017): *Degradation of per-fluorooctanyl sulfonate by strain Pseudomonas plecoglossicida 2.4-D*, «Appl Biochem Microbiol.», 53, pp. 533-538, <https://doi.org/10.1134/S0003683817050027>
- GALE E.F. (1952): *The chemical activities of bacteria*, New York, Academic Press, pp. 234.
- HUANG S. AND JAFFÉ P.R. (2019): *Defluorination of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) by Acidimicrobium sp. Strain A6*, «Environmental Science & Technology», 53, 19, 11410-11419, DOI: 10.121/acs.est.9b04047.
- MC CARTY P.L. (1997): *Breathing with chlorinated solvents*, «Science», Jun 6, 276 (5318), 1521-2. doi: 10.1126/science.276.5318.1521. PMID: 9190688.
- YI L.B., CHAI L.Y., XIE Y., PENG Q.J., PENG Q.Z. (2016): *Isolation, identification, and degradation performance of a PFOA-degrading strain*, «Genetics and Molecular Research», May, 15 (2). DOI: 10.4238/gmr.15028043. PMID: 27173322.

SIMONA DALY¹

I microbi nei bioprocessi industriali

¹ Gnosis by Lesaffre

I. INTRODUZIONE

Uno dei settori in cui i microrganismi sono da sempre largamente impiegati è quello dei processi industriali per la produzione di sostanze destinate alla cura o prevenzione di malattie, o comunque al miglioramento della qualità della vita. Tali microrganismi comprendono principalmente batteri e lieviti, ma anche virus, fagi, alghe unicellulari, ed è grazie all'uso delle biotecnologie che le loro attività biologiche naturali possono essere utilizzate come tali, oppure modificate, per ottenere prodotti a livello industriale.

I microrganismi e i bioprocessi sono stati utilizzati fin da epoche storiche molto lontane, all'inizio a scopo per lo più alimentare per la trasformazione spontanea di materie prime, come batteri lattici fermentanti usati per produrre formaggio e yogurt dal latte, o lieviti usati per le prime fermentazioni per ottenere birra, vino, pane.

Con l'identificazione degli agenti responsabili di tali trasformazioni nascono le biotecnologie, processi di trasformazione guidati e controllati che hanno avuto un enorme sviluppo nel corso degli ultimi due secoli. Sono proprio le ricerche di Louis Pasteur sulla fermentazione lattica e alcolica, e l'identificazione del lievito come agente responsabile della trasformazione del mosto in vino, a essere considerati la pietra miliare per la nascita della microbiologia industriale. Con i suoi studi Pasteur dimostrò infatti che i processi fermentativi sono di origine microbica e poco più tardi furono identificati gli enzimi, sostanze contenute nei microrganismi, responsabili delle proprietà trasformanti del microrganismo stesso (Cadeddu, 1991). Verso la fine del XIX secolo i bioprocessi hanno iniziato a essere condotti in condizioni guidate e controllate e nella prima metà del '900 furono messi a punto i primi processi industriali

per ottenere su larga scala prodotti quali solventi, come acetone e butanolo, acidi organici come l'acido citrico. Accanto a queste applicazioni, che restano ad oggi sfruttate industrialmente e di grande importanza, l'uso dei microrganismi si è via via esteso ad altri settori e campi di applicazione, tra cui quello farmaceutico. Il primo farmaco prodotto sfruttando le proprietà dei microrganismi è stata la penicillina, nel 1943, subito seguita da altri antibiotici.

Sempre nella prima metà del Novecento vengono formulate le leggi che regolano la catalisi enzimatica e mediante gli enzimi si scopre che con la fermentazione è possibile realizzare modificazioni strutturali di molecole complesse, difficilmente ottenibili per mezzo della chimica classica di sintesi. Si riescono in tal modo a produrre antibiotici modificati, cortisone e suoi analoghi, aminoacidi. L'interesse commerciale dei processi fermentativi si allarga così anche verso volumi più piccoli di prodotti ad alto valore aggiunto, molecole ad attività biologica impiegate per prevenzione o cura di diverse patologie (Manzoni, 2008).

Grazie alla scoperta di Mendel delle leggi dell'ereditarietà e poi alla descrizione di Watson e Crick, nel 1953, della struttura del DNA e le scoperte che gli sono succedute, le biotecnologie hanno definitivamente ricevuto un ulteriore impulso. La nascita negli anni '80 dell'ingegneria genetica e le applicazioni della tecnologia del DNA ricombinante hanno portato a un'ulteriore evoluzione e allo sviluppo delle biotecnologie innovative, bio-processi interessati da modificazioni genetiche dei microrganismi grazie alle quali diventano capaci di produrre molecole eterologhe, normalmente prodotte da altre cellule animali, di cui l'insulina è il capostipite, seguita da altre quali interferone, interleuchine, ormone della crescita, ottenibili da ceppi modificati appartenenti a diverse specie tra cui *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*.

L'ottenimento di tali metaboliti tramite tecniche genetiche ha reso disponibili prodotti con caratteristiche chimico-strutturali costanti e definite e in quantità adeguate alle richieste di mercato. Tale approccio consente inoltre ai pazienti di evitare rischi di contaminazione da agenti virali o prioni, potenzialmente presenti nei derivati ottenuti per estrazione da organi.

La continua richiesta da parte del mercato di prodotti biotecnologici innovativi, ottenuti mediante fermentazione di microrganismi, ha stimolato il mondo delle fermentazioni ad applicare nuove tecnologie per ottimizzare le fasi produttive del processo, allo scopo non soltanto di migliorare le rese dei prodotti ma anche la qualità. Parallelamente si è assistito anche a un miglioramento dei processi di downstream, cioè di isolamento e recupero dei prodotti di fermentazione, che sono parte integrante del processo e spesso rappresentano la parte più costosa. L'estrazione e purificazione delle molecole prodotte dai microrganismi è infatti complessa per vari motivi, tra cui spesso la bassa

concentrazione dei prodotti e la loro sensibilità a diversi parametri quali pH, temperatura, sostanze chimiche.

Esistono oggi sul mercato molti prodotti, sia per il mercato farmaceutico che nutraceutico, ottenuti mediante processi di fermentazione industriali: antibiotici, farmaci antitumorali, ormoni, immunoregolatori, vitamine, enzimi, probiotici.

I processi di fermentazione per produzioni industriali avvengono all'interno di bioreattori, con specie microbiche pure, inoculate in un terreno sterile a composizione definita, mantenendo il controllo di numerosi parametri e condizioni di axenicità. La scelta del tipo di processo produttivo e del bioreattore da utilizzare deve tener conto di diversi fattori: le proprietà del microrganismo, il suo metabolismo, il prodotto che si vuole ottenere. Deve essere garantita una buona miscelazione dei componenti della brodocoltura, un buon trasferimento di ossigeno dall'aria alla brodocoltura, una buona dispersione del calore di combustione del metabolismo, il mantenimento delle condizioni di sterilità. Le dimensioni del bioreattore variano in funzione del processo e vanno da qualche decina di metri cubi fino a qualche centinaio. La fermentazione è generalmente condotta in agitazione per mantenere omogeneo l'ambiente ed evitare la formazione di gradienti, sia di cellule che dei componenti del terreno di coltura e dei gas. I dispositivi di agitazione sono costituiti dal motore e da un albero motore a cui sono ancorate le giranti e hanno una diversa configurazione, disegnata in funzione delle caratteristiche del processo e del tipo di cellule che si devono fermentare. Per microrganismi quali lieviti e la maggior parte dei batteri, e quindi per terreni a medio-bassa viscosità, si usano agitatori veloci, tra cui i più diffusi sono quelli a turbina, a palette, a elica marina. Gli agitatori lenti si usano invece per microrganismi miceliari, quali muffe e alcuni batteri, sono adatti a brodi ad alta viscosità.

Nei processi aerobi l'agitazione ha un ruolo di primaria importanza per consentire la dispersione uniforme dell'aria in tutta la coltura e consentire così un apporto costante di ossigeno alle cellule microbiche. L'agitazione e l'aerazione sono quindi strettamente controllate, monitorando i livelli di ossigeno disciolto. L'ossigeno necessario per il metabolismo cellulare è fornito alla coltura come aria che viene compressa, filtrata e immessa nel bioreattore dal basso utilizzando la linea dell'aria. Le bolle di aria alla base del bioreattore, grazie a un sistema di distribuzione, lo sparger, risalgono all'interno della coltura fino alla superficie, rilasciando nel cammino l'ossigeno e recuperando l'anidride carbonica risultante dal metabolismo cellulare. Nella parte alta del bioreattore sono posizionate diverse entrate e uscite, controllate da elettrovalvole. Le entrate sono necessarie per l'inoculo della coltura e per eventuali aggiunte (nutrienti, correttori di pH, agenti antischiuma) nel corso del processo.

Le uscite sono impiegate per l'aria esausta ed eventuali prelievi da effettuare nel tempo per monitorare il processo. I bioreattori sono dotati di elettrodi per il controllo delle diverse variabili, quali temperatura, pH, flusso e pressione d'aria, formazione di schiuma, concentrazione di nutrienti, metaboliti e cellule. I dispositivi per la misura e la regolazione delle variabili erano un tempo semplici accessori meccanici, ora sostituiti da complessi sistemi elettronici, gestiti via computer.

La temperatura all'interno del bioreattore è mantenuta a livelli ottimali per le esigenze del microrganismo, mediante dispositivi interni o esterni. Il sistema a serpentina interna, tradizionale tecnologia dei primi bioreattori, è stato per lo più sostituito dal sistema a camicia, un'intercapedine che avvolge il bioreattore e in cui circola acqua a una determinata temperatura. In altri casi invece i bioreattori sono equipaggiati di scambiatori di calore esterni, che risultano ancora più efficienti nello scambio di calore e migliori anche per facilità di ispezione e manutenzione (Meyer et al., 2017).

Lo sviluppo di un processo fermentativo comprende diverse fasi che iniziano dalla selezione, isolamento, identificazione e caratterizzazione del microrganismo capace di produrre il prodotto di interesse e proseguono con la fase di miglioramento del ceppo per aumentare la produttività. Parallelamente vengono studiate e ottimizzate le condizioni di fermentazione, il terreno di coltura, i diversi parametri di controllo, lavorando su scala laboratorio e passando poi alla scala pilota, all'interno di bioreattori di dimensioni che vanno da pochi litri a qualche centinaio. Il processo produttivo così configurato viene trasferito alla scala industriale dove è testato in accordo ai criteri delle GMP (Good Manufacturing Practices) e convalidato mediante la produzione di lotti industriali.

Numerosi sono i vantaggi dell'uso di un processo di fermentazione per la preparazione di prodotti naturali: controllo sia della fonte naturale, rappresentata da un ceppo selezionato e stabilizzato, che del substrato e dei parametri di conduzione della fermentazione, possibilità di ottimizzazione delle fasi di fermentazione e purificazione, elevate rese produttive, costanza del processo e della qualità del prodotto.

2. ANTIBIOTICI GLICOPEPTIDICI

Tra i farmaci ottenuti mediante fermentazione di microrganismi ci sono gli antibiotici glicopeptidici, impiegati per il trattamento di infezioni gravi causate da patogeni Gram positivi come *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Clostridium difficile*. Sono la terapia di primo intervento per infezioni causate

da *S. aureus* meticillino-resistente, principale causa di infezioni ospedaliere nel mondo, e sono usati anche per trattare le infezioni causate da *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium*, che sono naturalmente resistenti ad altre classi di antibiotici e capaci di acquisire facilmente ulteriore resistenza attraverso mutazione o trasferimento genico orizzontale.

Gli antibiotici glicopeptidici clinicamente importanti includono antibiotici di prima generazione, come teicoplanina e vancomicina che, sebbene scoperti molti decenni fa, continuano a essere ampiamente utilizzati in ambito clinico, e antibiotici glicopeptidici di seconda generazione, quali dalbavancina, oritavancina e telavancina che sono invece stati più recentemente approvati per uso clinico, grazie alla loro maggiore potenza antimicrobica e alle loro proprietà farmacocinetiche superiori.

Teicoplanina e vancomicina sono metaboliti naturali prodotti da attinomiceti filamentosi, rispettivamente *Actinoplanes teichomyceticus* e *Amycolatopsis orientalis*. Sono molecole ad alto peso molecolare con uno scaffold comune rappresentato da un eptapeptide, legato a residui di zucchero e gruppi metilici e, nel caso della teicoplanina, ad una catena lipidica. Dalbavancina, oritavancina e telavancina sono invece loro derivati semi sintetici, hanno una potenza antimicrobica superiore al glicopeptide progenitore e causano effetti secondari di minore entità.

La grande maggioranza degli antibiotici glicopeptidici è stata scoperta mediante screening di molecole prodotte naturalmente da attinomiceti del suolo raccolti in tutto il mondo. La vancomicina è stato il primo antibiotico glicopeptidico, isolato nel 1953 da un microrganismo isolato da un campione di suolo dell'Indonesia e approvato dalla FDA qualche anno più tardi per il trattamento di infezioni da *Staphylococcus* penicillino-resistenti.

La limitata resa dei ceppi produttori wild-type ha richiesto negli anni un grande lavoro di miglioramento dei processi di fermentazione, con l'ottimizzazione dei componenti del terreno di coltura e dei parametri di fermentazione, uso industriale di terreni complessi, a basso costo, processi fed-batch per prolungare la fase di crescita del microrganismo senza inibire la produzione di metaboliti secondari (Fedorenko et al., 2015). L'ottimizzazione della fermentazione è stata condotta in parallelo con il lavoro di miglioramento dei microrganismi, sia con tecniche di microbiologia classica, quali random mutagenesi e screening di determinati tratti fenotipici associati a una maggiore produttività, sia più recentemente anche con l'applicazione delle tecniche di ingegneria genetica, agendo sulla regolazione e deregolazione del metabolismo secondario.

Grazie all'avvento delle tecnologie di sequenziamento le vie biosintetiche degli antibiotici glicopeptidici sono state in gran parte delucidate. Paralle-

lamente, negli ultimi due decenni è stato dedicato un enorme sforzo allo sviluppo di strumenti molecolari per manipolare geneticamente questi attinomiceti che sono poco adattabili alle comuni tecniche di trasformazione utilizzate per *E. coli* o per gli streptomiceti più facili da maneggiare (Kieser et al., 2000).

Questi progressi hanno creato le condizioni per passare dalla mutagenesi casuale all'ingegnerizzazione genetica sito-specifica per il miglioramento produttivo degli attinomiceti. Negli ultimi 70 anni, dalla scoperta della vancomicina, il lavoro fatto sulla caratterizzazione, produzione e modifica degli antibiotici glicopeptidici ha rappresentato un grande sforzo che ha utilizzato un'ampia gamma di approcci microbiologici, chimici, biochimici, genetici, genomici e metagenomici, consentendo di accrescere le conoscenze di questa classe clinicamente importante di antibiotici e, più in generale, contribuendo alla comprensione della biochimica dei prodotti naturali e del metabolismo secondario negli attinomiceti (Marcone et al., 2018).

La struttura complessa di questi glicopeptidi e il fatto che in alcuni casi, ad esempio la teicoplanina, i principi attivi clinicamente approvati dalla FDA siano in realtà miscele costituite da molecole che differiscono strutturalmente di poco l'una dall'altra, e che sono combinate in percentuali definite nel principio attivo, fa sì che l'unica fonte possibile per l'ottenimento degli antibiotici glicopeptidici naturali e dei loro derivati semi sintetici rimanga la fermentazione degli attinomiceti del suolo (Taurino et al., 2011).

3. VITAMINA K2

Un altro esempio di prodotto ottenuto grazie ai bioprocessi, sfruttando le proprietà naturali dei microrganismi, è la vitamina K2, in particolare il suo isomero MK-7.

La vitamina K2 fa parte della famiglia della vitamina K, un gruppo di composti liposolubili con attività emostatica, antiossidante e anti-osteoporosi. Fu scoperta per correlazione a un disturbo della coagulazione del sangue osservato nell'ambito di uno studio sugli effetti di una dieta povera di colesterolo in polli, in cui si scoprì che il fenomeno emorragico non era causato dalla privazione di colesterolo ma dalla carenza di un fattore antiemorragico contenuto nella frazione lipidica della dieta, una "Vitamina Koagulante", poi denominata vitamina K.

Le vitamine appartenenti alla famiglia K hanno una struttura chimica comune, un anello naftochinonico legato a una catena laterale alifatica, e differiscono per composizione e lunghezza delle catene laterali, che sono responsabili

del diverso assorbimento, trasporto, distribuzione tissutale e biodisponibilità delle forme di vitamina K.

La vitamina K1, fillochinone, è di origine vegetale, interviene nei processi di coagulazione del sangue, agisce sul fegato. La vitamina K2, menachinone, è di origine batterica e agisce, oltre che a livello epatico, soprattutto a livello di apparato osseo e sistema vascolare. In base alla lunghezza della catena laterale, formata da unità isopreniche ripetute, si possono differenziare diversi menachinoni (MK-n). La vitamina K3, menadione, è invece di origine sintetica ed è componente di farmaci che agiscono per regolare i processi di coagulazione del sangue.

La vitamina K2 è essenziale per la funzione di numerose proteine che legano il calcio, in particolare l'osteocalcina e la proteina GLA della matrice, entrambe coinvolte nel mantenimento della struttura del sistema osteoarticolare, dei denti, della parete arteriosa e per la regolazione della crescita cellulare. L'aumento dell'assunzione di vitamina K2 si traduce così in ossa più sane e un sistema cardiovascolare più sano.

Gli effetti positivi della vitamina K2 sul sistema cardiovascolare sono descritti in molti studi clinici, tra cui il Rotterdam Study, un ampio studio svolto per un periodo di 10 anni, con il coinvolgimento di circa 5.000 uomini e donne di età superiore ai 55 anni, pubblicato nel 2004. Fu esaminata l'associazione tra l'assunzione con la dieta di fillochinone e di menachinone e l'incidenza di malattie cardiovascolari. I risultati dimostrarono che l'assunzione di menachinoni era direttamente correlata a una riduzione di eventi di calcificazione dell'aorta, di malattie coronariche e in generale di mortalità. L'apporto dietetico di menachinoni nella popolazione studiata derivava principalmente da formaggi, che sono ricchi in vitamina K2, in particolare MK-7, MK-8 e MK-9. Si arrivò così a concludere che fossero i menachinoni contenuti nella dieta i principali responsabili dei benefici sul sistema cardiovascolare osservati in pazienti che facevano largo uso di formaggi, rispetto a pazienti che seguivano regimi alimentari con maggior consumo di verdure, particolarmente ricche di vitamina K1 (Hofman et al., 2007). Studi successivi hanno confermato che la vitamina K2, e soprattutto i suoi isomeri chiave MK-4 e MK-7, sono essenziali per il mantenimento della salute delle ossa e nella prevenzione delle malattie cardiovascolari e che MK-7 è particolarmente efficace grazie ad una maggiore biodisponibilità e ad un'emivita più lunga rispetto agli altri isomeri.

Soprattutto con i regimi alimentari moderni, il consumo giornaliero di alimenti ricchi di vitamina K2 spesso non è sufficiente a coprire il fabbisogno dell'organismo e diventa quindi utile integrarlo con un apporto esterno di vitamina K2 naturale, in particolare MK-7. Per questi motivi il consumo e quindi il mercato della vitamina K2 sono cresciuti moltissimo negli ultimi anni.

La fonte naturale principale di vitamina K2-MK7, prodotta anche da alcuni batteri intestinali, è il natto, alimento tradizionale giapponese prodotto attraverso la fermentazione di fagioli di soia. La presenza di natto nel regime alimentare in Giappone risale a molti secoli fa, all'epoca dei samurai la cui dieta includeva il natto perché ritenevano che aumentasse la loro forza e capacità di reazione nei combattimenti.

Agli inizi del '900 il microrganismo responsabile della fermentazione della soia fu identificato, si trattava di un particolare *Bacillus subtilis*, che fu denominato *Bacillus subtilis natto* (Sanders et al., 2003).

Sfruttando le proprietà naturali di questo microrganismo è così stato possibile sviluppare una piattaforma di produzione di vitamina K2, basata sulla fermentazione di *B. subtilis natto* come produttore naturale di MK-7 (EP 1803820, US 7,718,407 and JP 5043425).

4. CONCLUSIONI

Grazie ai microrganismi e alle biotecnologie è quindi possibile mettere sul mercato prodotti naturali, innovativi, che consentono di sostituire prodotti di provenienza animale o sintetizzati chimicamente. È inoltre attiva e sempre più presente la ricerca di tecnologie nuove che consentano di ridurre il consumo di materie prime e di acqua e la produzione di rifiuti, per avere processi a minore impatto ambientale.

RIASSUNTO

Un importante settore d'impiego dei microrganismi è rappresentato dai bioprocessi industriali che utilizzano le biotecnologie per creare prodotti che migliorano la qualità della vita delle persone. Grazie alle biotecnologie si possono ottenere prodotti a livello industriale impiegando i microrganismi, controllando e modificando le loro attività biologiche naturali. L'uso biotecnologico dei microrganismi ha radici antiche, con le biotecnologie convenzionali che nascono utilizzando i microrganismi per la trasformazione spontanea di materie prime alimentari e si evolvono poi grazie ai numerosi campi di applicazione, tra i quali quello farmaceutico.

A partire dalla metà del '900 sono stati sviluppati bio-processi per produzione industriale di penicillina e altri antibiotici e successivamente di piccoli volumi di molecole ad alto valore aggiunto impiegate per prevenzione o cura di diverse patologie. L'ulteriore evoluzione ha portato allo sviluppo delle biotecnologie innovative, bio-processi interessati da modificazioni genetiche grazie alle quali i microrganismi diventano capaci di produrre molecole normalmente prodotte da altre cellule animali, dei quali l'insulina è il capostipite. Esistono oggi sul mercato molti prodotti ottenuti per biosintesi o biotrasformazioni applicando la tecnologia

delle fermentazioni industriali: antibiotici, antitumorali, immunoregolatori, nutraceutici, vitamine, ne è un esempio la vitamina K2. L'uso dei bio-processi garantisce anche un continuo miglioramento della qualità dei prodotti e una maggiore attenzione all'ambiente.

ABSTRACT

The microorganisms in the industrial bioprocesses. A relevant sector of the use of microorganisms is represented by the industrial bioprocesses that exploit biotechnologies to create products that improve the quality of life of people. Thanks to biotechnologies it is possible to obtain products at an industrial level using microorganisms, controlling and modifying their natural biological activities. The biotechnological use of microorganisms has ancient roots, with conventional biotechnologies that arise by exploiting microorganisms for the spontaneous transformation of food raw materials and then evolve thanks to the encounter with numerous fields of application, including the pharmaceutical one. Starting from the mid-1900s, bioprocesses developed for the industrial production of penicillin and other antibiotics and subsequently for small volumes of high value-added molecules used for the prevention or treatment of various diseases. Further evolution has led to the development of innovative biotechnologies, bioprocesses affected by genetic modifications thanks to which microorganisms become capable of producing molecules normally produced by other animal cells, of which insulin is the progenitor. Today there are many products on the market obtained by biosynthesis or biotransformations by applying industrial fermentation technology: antibiotics, anticancer, immunoregulators, nutraceuticals, vitamins, vitamin K2 is an example. The use of bioprocesses also guarantees a continuous improvement in product quality and greater attention to the environment.

BIBLIOGRAFIA

- CADEDU A. (1991): *Dal mito alla storia*, Franco Angeli, Milano, pp. 137-138.
- HOFMAN A., BRETELER M. M., VAN DUIJN C. M., KRESTIN G. P., POLS H. A., STRICKER B. H., TIEMEIER H., UITTERLINDEN A. G., VINGERLING J. R., WITTEMAN J. C. (2007): *The Rotterdam Study: objectives and design update*, «European journal of epidemiology», 22 (11), pp. 819-829.
- MANZONI M. (2005): *Microbiologia Industriale*, in *Enciclopedia della Scienza e della tecnica*, Istituto Treccani.
- MEYER H.P., MINAS W., SCHMIDHALTER D. (2017): *Industrial-Scale Fermentation*, in *Industrial Biotechnology: Products and Processes*, Edited by Christoph Wittmann and James C. Liao, pp. 3-53.
- FEDORENKO V., GENILLOU O., HORBAL L., MARCONE G.L., MARINELLI F., PAITAN Y., RON E.Z. (2015): *Antibacterial discovery and development: from gene to product and back*, «BioMed Research International», 591349.
- KIESER T., BIBB M.J., BUTTNER M.J., CHATER K.F., HOPWOOD D.A. (2000): *Practical Streptomyces Genetics*, John Innes Foundation, Norwich.

- MARCONI G.L., BINDA E., BERINI F., MARINELLI F. (2018): *Old and new glycopeptide antibiotics: From product to gene and back in the post-genomic era*, «Biotechnology Advances», 36, pp. 534-554.
- TAURINO C., FRATTINI L., MARCONI G.L., GASTALDO L., MARINELLI F. (2011): *Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121 as a cell factory for producing teicoplanin*, «Microb. Cell Factories», 10 (1), pp. 82-94.
- SANDERS M.E., MORELLI L., TOMPKINS T.A. (2003): *Sporeformers as Human Probiotics: Bacillus, Sporolactobacillus, and Brevibacillus*, «Compr Rev Food Sci Food Saf», 2 (3), pp. 101-110.

Finito di stampare
presso E. Lui Tipografia (Reggiolo - RE)
nel mese di aprile 2023