



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
Biologia Cellulare e delle Strutture Sopramolecolari

CICLO XXI

COORDINATORE Prof. Grazi Enrico

Fermentazione con *Bacillus Stereothermophilus*: produzione di 2,3-butandiolo, studio della via metabolica ed applicazioni biocatalitiche

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/06

Dottorando

Dott. Mantovani Matteo

Tutore

Prof. Pedrini Paola

Anni 2006/2008

INDICE

<i>1. Introduzione</i>	<i>pag. 3</i>
<i>1.1. 2,3-Butandiolo: batteri produttori e via metabolica</i>	<i>pag. 12</i>
<i>1.2. Produzione di 2,3-butandiolo: fonti di carbonio, condizioni operative e recupero del prodotto</i>	<i>pag. 17</i>
<i>1.3. Bacillus stearothermophilus</i>	<i>pag. 21</i>
<i>2. Progetto</i>	<i>pag. 23</i>
<i>3. Parte sperimentale</i>	<i>pag. 26</i>
<i>3.1. Materiali</i>	<i>pag. 27</i>
<i>3.2. Metodi</i>	<i>pag. 28</i>
<i>3.3. Fermentazioni</i>	<i>pag. 33</i>
<i>3.4. Studio della via metabolica</i>	<i>pag. 59</i>
<i>3.5. Applicazioni biocatalitiche</i>	<i>pag. 68</i>
<i>4. Risultati e discussione</i>	<i>pag. 70</i>
<i>5. Bibliografia</i>	<i>pag.95</i>

1. INTRODUZIONE

Una delle problematiche affrontate attualmente a livello mondiale è quella di individuare in molteplici campi nuove metodologie che riducano l'impatto dell'uomo sull'ambiente. Da un punto di vista applicativo, negli ultimi decenni, sono state sviluppate tecnologie che si avvalgono di organismi viventi, o di parti di essi, per produrre sostanze utili all'uomo, comunemente indicate con il termine di biotecnologie. Negli anni queste tecniche hanno trovato impiego in molteplici campi, fra i quali spiccano la produzione di antibiotici nell'industria farmaceutica e la biocatalisi in chimica organica, quest'ultima utilizzata nella sintesi di "building block" chirali. Recentemente, di fronte all'esigenza di ridurre i consumi di petrolio e dei suoi derivati, un campo delle biotecnologie in crescente sviluppo è la produzione di biocarburanti.

D'altra parte i primi esempi di fermentazioni risalgono ai primordi della civiltà. Documenti Sumeri testimoniano che la birra era ottenuta per fermentazione dell'orzo più di 5000 anni fa. La Bibbia, raccontando di Noè, parla del vino in documenti che risalgono al primo millennio a.C. Fin dalla più remota antichità l'uso delle fermentazioni per la preparazione e la conservazione di cibi e bevande era largamente diffuso presso tutte le civiltà conosciute.

Il passaggio da una conoscenza esclusivamente empirica ad una conoscenza scientifica e sistematica delle fermentazioni iniziò sul finire del settecento con gli studi di Lavoisier e Gay-Lussac quando la fermentazione alcolica venne assimilata alla decomposizione del glucosio secondo la reazione chimica:



Successivamente gli studi riguardanti la produzione di alcol con *Saccharomyces cerevisiae* effettuati separatamente da Pasteur e da Liebig portarono alla formulazione di due teorie contrastanti, quella vitalistica e quella chimica, per spiegare il ruolo dei microorganismi nelle fermentazioni. La prima indicava la necessità di un organismo vivente per far avvenire il processo, mentre la seconda imputava l'attività catalitica a sostanze azotate presenti nel brodo di coltura. Alla fine dell'ottocento le scoperte fatte da E. ed H. Buchner mostrarono definitivamente la relazione che lega microorganismi ed enzimi, dimostrando quindi che le cellule possono essere assimilate a dei minuscoli

reattori chimici tenuti in efficienza da migliaia di reazioni dipendenti da altrettanti enzimi specifici.

Sviluppi successivi riguardanti lo studio del funzionamento degli enzimi e, in seguito alla scoperta del DNA, del funzionamento generale delle cellule viventi hanno posto le basi delle moderne biotecnologie. Basandosi su una maggiore conoscenza dei processi presenti all'interno delle cellule furono effettuate delle modificazioni sull'ambiente di reazione o sui microrganismi utilizzati nei normali processi produttivi, ottenendo incrementi notevoli sia nella resa che nella gamma di composti ottenibili.

Lo sviluppo delle tecnologie fermentative nel corso dell'ultimo secolo è stato però piuttosto variabile, risentendo molto della concorrenza derivante dai prodotti provenienti dall'industria petrolchimica.

Negli ultimi decenni l'interesse verso queste tecnologie è stato riscoperto per via dei notevoli sviluppi ottenuti grazie all'ingegneria genetica che hanno permesso di trovare un'alternativa valida alle normali metodologie chimiche, anche se questi processi risultano essere molto più costosi pur essendo ecocompatibili. Bisogna anche considerare che i prevedibili aumenti del prezzo del petrolio e il suo veloce consumo sicuramente rappresentano due fattori che hanno dato spinta alla ricerca di nuove tecnologie economicamente valide, basate sull'utilizzo di sostanze rinnovabili.

L'impiego delle biotecnologie in campo medico ha portato alla scoperta di numerosi metaboliti utilizzati in seguito come farmaci. L'esempio sicuramente più noto è dato la scoperta fatta nel 1929 da A. Fleming, che riguardava la capacità del fungo *Penicillium notatum* di produrre e rilasciare nel terreno di coltura un agente antibatterico, la penicillina, capace di distruggere le colonie di *Staphylococcus aureus*.

Questo risultato ha dato il via a molti altri progetti che, utilizzando cellule viventi, hanno portato alla scoperta e poi all'utilizzo di altre molecole con capacità antibatterica. Tra le più note si ricordano la streptomina e la tetramicina, prodotte da funghi del genere *Streptomyces spp.*, o gli antibiotici cloramfenicolo ed eritromicina ottenuti invece da batteri del genere *Bacillus* o *Pseudomonas*.

Un ulteriore esempio di farmaco di vasto utilizzo e prodotto per via microbiologica è l'insulina, attualmente ottenuta da colture di *Escherichia coli* geneticamente modificata. Un altro farmaco ricavato per via fermentativa da questo batterio è l'ormone della crescita, utilizzato nella cura del nanismo e per la guarigione delle ferite.

Grazie all'applicazione di nuove biotecnologie è stato possibile ottenere nuovi vaccini impiegati quotidianamente per la cura di malattie quali influenza, rabbia, epatite A, B, C ed herpes simplex.

In campo chimico le biotecnologie hanno trovato un ampio utilizzo. La capacità mostrata da alcuni organismi viventi di catalizzare reazioni chimiche, quali riduzioni, ossidazioni, idrossilazioni e condensazioni ha costituito un'alternativa alle normali metodologie di sintesi organica. L'impiego di nuove strategie sintetiche basate sull'utilizzo di microrganismi sta riscuotendo sempre maggior interesse e questo è sicuramente legato a più fattori fra i quali spiccano la ricerca di tecniche selettive (chemo-, regio- e stereoselettive) che permettano di ottenere molecole strutturalmente complesse da utilizzare in campo farmaceutico, l'utilizzo di metodiche più rapide e meno dispendiose per ottenere prodotti noti e sicuramente una spinta sempre maggiore verso tecniche ecocompatibili.

La tabella seguente riassume i vantaggi e gli svantaggi legati alle reazioni enzimatiche e a quelle chimiche (Tabella 1).

Parametri di reazione	Reazione enzimatica	Reazione chimica
temperatura	ambiente	generalmente alta
pressione	atmosferica	generalmente alta
solvente	acqua	solventi organici, acqua
specificità	alta	bassa
stereospecificità	alta	bassa
regiospecificità	alta	bassa
concentrazione	bassa	alta

Tabella 1. Confronto tra reazione enzimatica e chimica

L'impiego della catalisi enzimatica ha sicuramente alcuni svantaggi: la bassa concentrazione del substrato, che deve essere trasformato, e la necessità di lavorare in fase acquosa risultano essere i problemi principali. Questi limiti però possono essere facilmente superati adottando tecniche che permettono di mantenere costante la concentrazione del substrato di partenza e di allontanare in modo continuo il prodotto

che si forma; l'immobilizzazione dell'enzima o l'utilizzo di un sistema bifasico permette inoltre l'impiego della biocatalisi anche per molecole immiscibili in acqua.

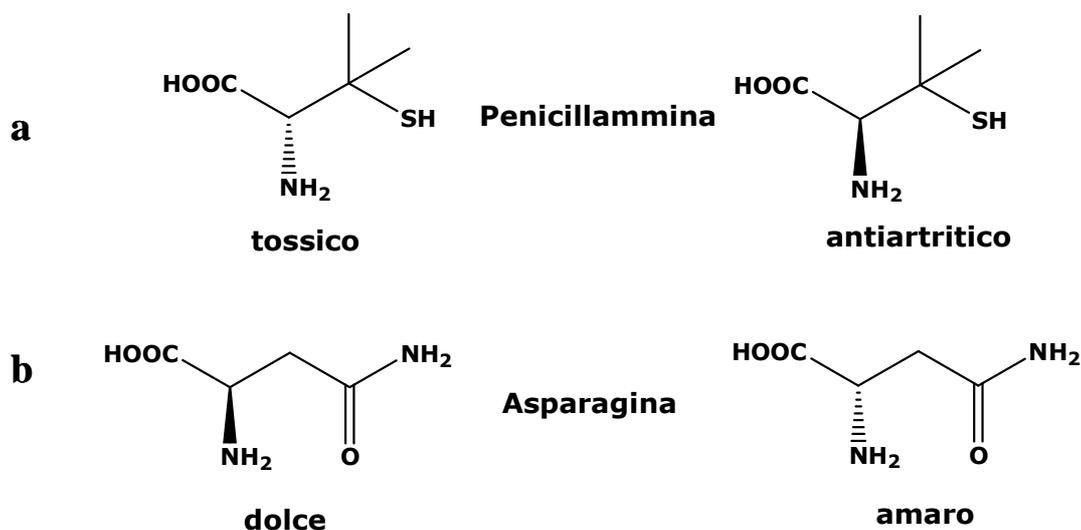
Effettuando reazioni biocatalizzate va preventivamente stabilito in che forma impiegare il biocatalizzatore; infatti le tecniche sviluppate finora permettono di lavorare con cellule intere o alternativamente con l'enzima necessario per la reazione.

Esistono numerosi pro e contro a questa questione che vengono riassunti nella tabella seguente (Tabella 2).

Sistema di biotrasformazione	Vantaggi	Svantaggi
Cellule intere	Economiche	Sono richieste esperienza microbiologica e apparecchiature di fermentazione
		Rimozione delle cellule e separazione dei prodotti lunghe e tediose
	Enzimi e cofattori presenti	Possibilità di reazioni collaterali
		Utilizzo di cosolventi organici per il trasporto dei substrati e/o prodotti dentro e fuori dalle cellule
Enzimi isolati	Apparecchiature semplici	Costosi
	Processo facile da controllare	Aggiunta dei cofattori
	Separazione semplice	Riciclo dei cofattori per processi su larga scala
	Alta stereospecificità	
	Cosolventi tollerati meglio	

Tabella 2. Vantaggi e svantaggi nell'utilizzo di cellule ed enzimi

L'utilizzo di microrganismi od enzimi isolati per catalizzare passaggi sintetici ha permesso spesso di ottenere prodotti con un'elevata purezza ottica, riducendo nel contempo il numero di step di reazione. Questo fattore risulta essere molto importante nella sintesi di farmaci, che generalmente risultano curativi solo in una determinata configurazione. Infatti tutti i processi biochimici che avvengono in un organismo vivente sono governati da enzimi. Dal momento che la maggior parte di essi è altamente selettiva nei confronti di composti chirali, è normale che gli enantiomeri di un composto bioattivo come un farmaco o un composto agrochimico diano differenti effetti biologici. Di conseguenza i due enantiomeri possono essere considerati come due specie differenti: quello che presenta attività più alta è chiamato eutomero, mentre l'altro viene chiamato distomero. La necessità di utilizzare farmaci enantiomericamente puri deriva spesso dal fatto che la presenza del distomero può parzialmente diminuire l'attività dell'eutomero, arrivando a volte ad essere tossico. Di seguito vengono riportati due esempi di come due enantiomeri possano presentare caratteristiche molto differenti (Schema 1).

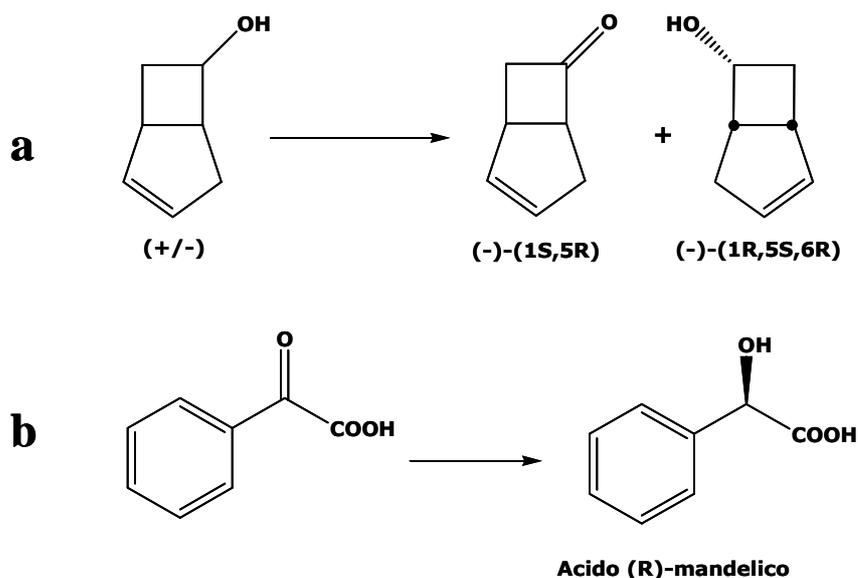


Schema 1. Diverse caratteristiche di due coppie di enantiomeri

Il primo esempio (Schema 1a) mostra come i due enantiomeri della penicillamina possano avere effetti molto diversi sull'organismo umano; infatti l'enantiomero S viene tuttora utilizzato come farmaco antiartritico, mentre il distomero presenta un'elevata tossicità. Il secondo esempio (Schema 1b) riguarda la diversa interazione con i recettori

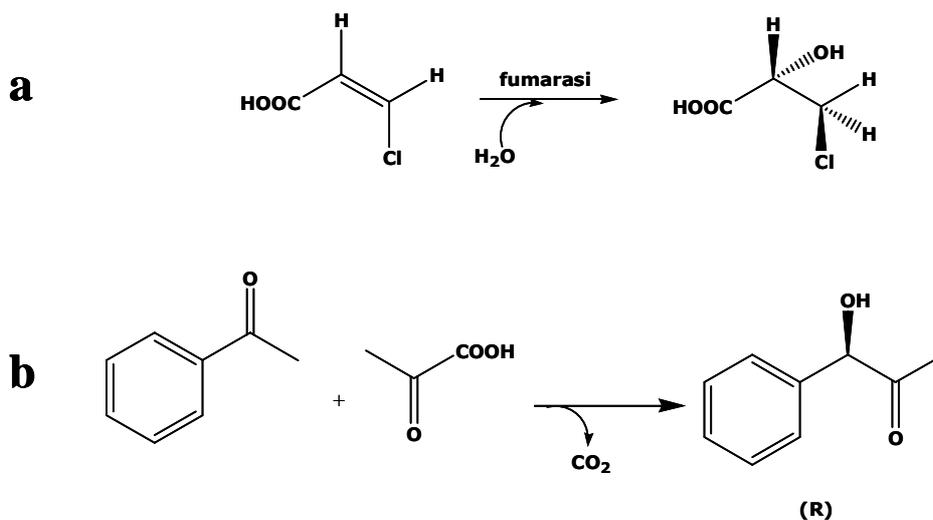
del gusto dei due enantiomeri dell'aparagina, un amminoacido, che nella forma R ha un sapore dolce ed è utilizzato come dolcificante ipocalorico.

L'applicazione delle moderne biotecnologie in sintesi asimmetrica ha permesso di realizzare ossidazioni enantioselettive utilizzate per la risoluzione di miscele racemiche di alcol biciclici aventi strutture chimiche complesse¹ (Schema 2a) oppure la riduzione stereoselettiva di chetoni, chetoacidi² (Schema 2b), o più in generale molecole aventi una o più funzioni carboniliche.



Schema 2. Reazioni redox enantioselettive

Ulteriori applicazioni biocatalitiche in sintesi organica riguardano le addizioni di una molecola d'acqua su un'olefina per ottenere un nuovo centro chirale; questo è un processo che con le normali metodiche non consente di ottenere un prodotto enantiomericamente puro in un singolo passaggio. Studi effettuati a metà degli anni ottanta hanno invece dimostrato che è possibile svolgere questa reazione in singolo step utilizzando una fumarasi³ (Schema a 3a), ricavando a fine processo prodotti con un'elevata purezza ottica. Un ultimo esempio riguardante questo campo può essere rappresentato dai processi di biocatalisi usati per formare nuovi legami carbonio-carbonio. E' stato scoperto che molti lieviti possiedono al loro interno enzimi capaci di effettuare delle addizioni fra acetaldeidi attivate e aldeidi aromatiche⁴ (Schema 3b), ottenendo risultati paragonabili in termini di resa alle normali tecniche di sintesi.



Schema 3. Reazioni di addizione e condensazione

Oggi, data la progressiva diminuzione delle fonti di petrolio e il problema dell'aumento dell'anidride carbonica in atmosfera legata all'utilizzo dei combustibili fossili per la produzione di energia, la produzione di biocarburanti da fonti rinnovabili è diventata uno degli obiettivi delle biotecnologie.

Si stima che i trasporti all'interno dell'Unione Europea sono i responsabili del 21% di tutte le emissioni di gas serra a livello mondiale e questo valore è in lento e costante aumento. La diminuzione delle emissioni di gas inquinanti indicata nel protocollo di Kyoto impone una continua ricerca volta a trovare nuove tecnologie per sostituire parzialmente o totalmente i normali carburanti, permettendo inoltre una sempre minor dipendenza dell'UE dalle importazioni di petrolio grezzo e di gas.

In questo contesto i carburanti derivanti da materie prime rinnovabili, da scarti industriali o da rifiuti umidi urbani trovano un ruolo di primo piano rappresentando una valida alternativa ai combustibili di origine fossile.

Negli ultimi anni in Europa i biocarburanti sono stati impiegati come additivi dei normali combustibili ma in percentuale molto ridotta (5%); il motivo risiede nel fatto che i normali propulsori necessiterebbero di modifiche sostanziali per poter funzionare con percentuali maggiori o addirittura solo con biocarburanti. La direttiva 2003/30/CE

prevede un aumento di questa percentuale, che dovrà raggiungere il 10% entro i prossimi dieci anni.

I biocarburanti più studiati e attualmente impiegati sono due: il biodiesel, ottenuto da transesterificazione di oli vegetali e di scarto, e il bioetanolo, prodotto da fermentazione di matrici ricche di zuccheri.

Il bioetanolo è il biocarburante più diffuso a livello mondiale: attualmente la sua produzione annua supera i 35 miliardi di litri, per la maggior parte ottenuti ed utilizzati in Brasile e negli USA.

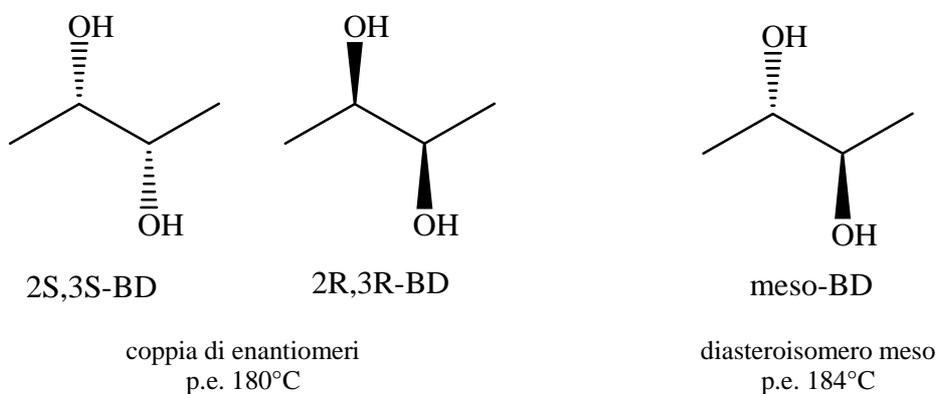
Nell'Unione Europea invece il bioetanolo è utilizzato prevalentemente per produrre bio-ETBE (etilterbutiletere), che può essere miscelato nella benzina con gli attuali standard fino al 15%. Questo prodotto è preferito al bioetanolo in quanto presenta una minore affinità per l'acqua, rendendo più facile quindi il suo stoccaggio, e non innalza la volatilità della benzina una volta miscelato.

Al contrario dell'etanolo, il biodiesel è oggi prevalentemente commercializzato in Europa e in linea teorica potrebbe essere utilizzato nei motori anche allo stato puro. Tuttavia all'interno del biodiesel sono presenti in elevata quantità idrocarburi insaturi e acidi organici che a lungo andare potrebbero determinare la corrosione di alcune parti dei motori.

Oltre a questi negli ultimi anni è stato analizzato e proposto l'impiego del 2,3-butandiolo come terza alternativa, viste le caratteristiche molto simili di questo prodotto rispetto al bioetanolo. Inoltre da questo diolo si ottiene facilmente per disidratazione il metietilchetone, prodotto con un elevato potere calorifico (27.198 J/g) oggi impiegato come incrementatore di ottani per combustibili utilizzati in aviazione.

1.1. 2,3-Butandiolo: batteri produttori e via metabolica

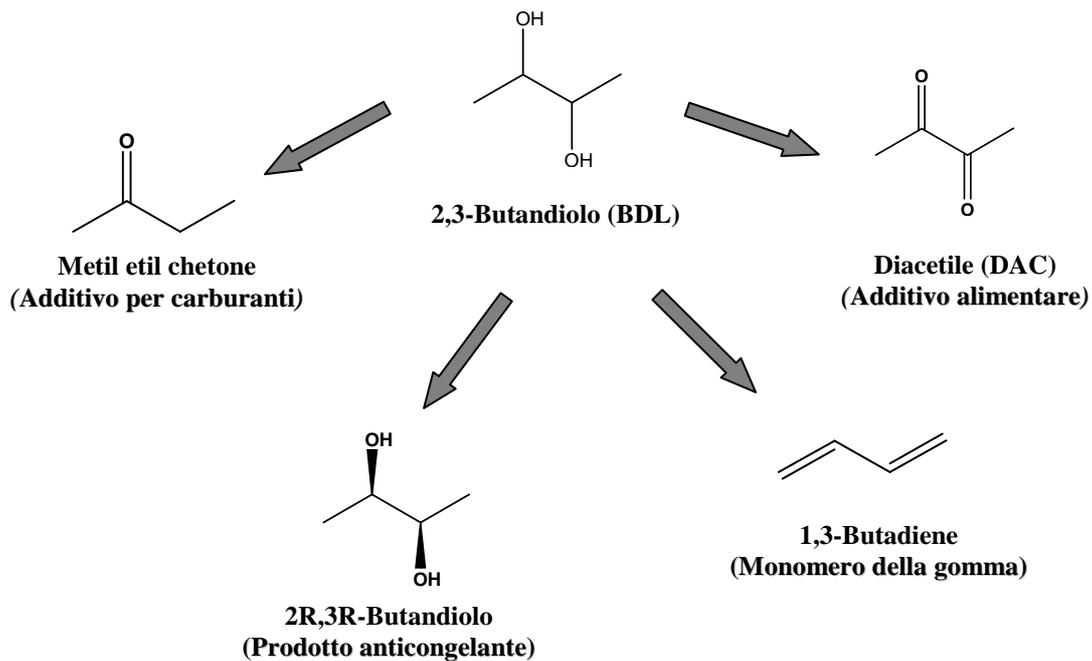
Il 2,3-butandiolo (2,3-BD), anche conosciuto come 2,3-butilenglicole o 2,3-diidrossibutano, è un composto chirale con peso molecolare di 90.12 KDa, punto di ebollizione elevato (180-184°C) e un punto di fusione a -60°C. E' un prodotto incolore ed inodore e lo si può trovare sia in forma cristallina che come olio denso. Come detto in precedenza questo diolo si presenta come miscela di stereoisomeri: la coppia enantiomerica (-)-2*R*,3*R*-BD / (+)-2*S*,3*S*-BD e la forma meso-BD (Schema 4).



Schema 4. Stereoisomeri del 2,3-butandiolo

Gli impieghi di questo prodotto sono svariati. Durante la 2^a guerra mondiale l'enorme richiesta di gomma sintetica ha reso strategica la sintesi di 2,3-butandiolo, che è il prodotto di partenza per ottenere l'1,3-butadiene, monomero essenziale nella sintesi della stessa gomma.

Oltre a questo il 2,3-butandiolo trova impiego come solvente chimico, come agente disinfettante e come potenziale anticongelante utilizzabile nell'industria motoristica. Se ossidato a diacetile può essere impiegato come aroma nell'industria alimentare mentre, come è stato menzionato prima, può essere convertito per disidratazione a metiletil chetone e utilizzato come biocarburante. Infine esterificando il 2,3-butandiolo è possibile ottenere vari precursori del poliuretano utilizzabili come medicinali, prodotti cosmetici e lozioni (Schema 5).

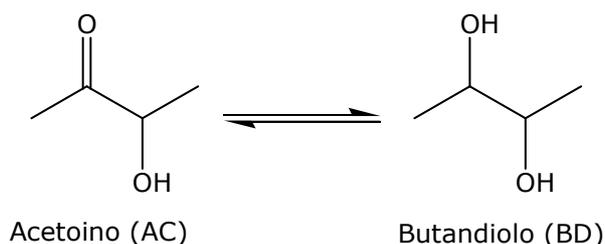


Schema 5. Applicazioni del 2,3-butandiol

Attualmente la produzione di questo diolo presenta una crescita annua costante compresa tra il 4% e il 7% ed è fortemente legata alla crescente richiesta di polimeri suoi derivati (elastan, polibutilentereftalato, γ -butirrolattone).

Negli ultimi anni, vista la scarsa economicità dei processi chimici che portano alla produzione del 2,3-butandiol, l'interesse per la produzione microbica di questo composto è notevolmente aumentato.

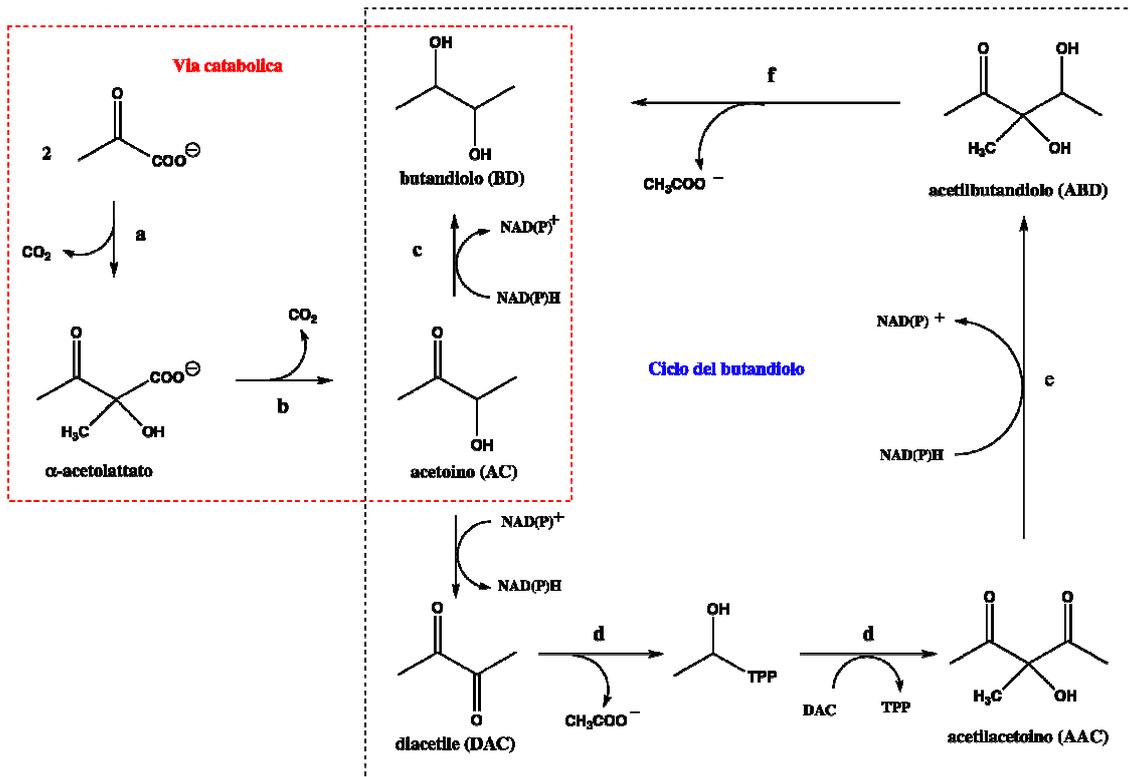
La formazione di 2,3-butandiol per via microbica può avvenire seguendo due vie metaboliche. Studi condotti su *Bacillus polymixa*⁵ hanno dimostrato che, oltre a 2,3-BDL, è possibile ottenere come sottoprodotti della fermentazione etanolo, acetato, lattato, formiato e succinato; oltre a questi metaboliti normalmente si verifica l'accumulo di acetoino, detto anche acetilmetil carbinolo, l'idrossichetone corrispondente del butandiol. Analizzando i prodotti ottenuti per via fermentativa da *Clostridium acetobutylicum* è stato successivamente scoperto che l'acetoino accumulato è il precursore del butandiol. E' stato inoltre proposta la reversibilità della reazione che porta da acetoino a 2,3-butandiol, catalizzata da un enzima nominato acetoino reductasi. Questo enzima è stato ampiamente studiato ed è stata verificata la sua capacità nel catalizzare irreversibilmente la riduzione del diacetile ad acetoino⁶ (Schema 6).



Schema 6. Acetoino e butandiol

Come riportato in precedenza il 2,3-butandiol esiste in tre forme stereoisomeriche. Normalmente la produzione di questo diolo per via microbica porta all'accumulo principalmente di due delle tre possibili forme; per esempio da *Bacillus polymyxa* o da *Aerobacillus polymyxa* si ottiene la levo-forma 2*R*,3*R*-BD con una purezza ottica vicina al 98%⁵, però con una resa relativamente bassa. La fermentazione con *Aeromonas hydrophila* porta invece ad una miscela di 2*S*,3*S*-BD e forma meso in rapporto 1:1, mentre da *Serratia marcescens* è possibile ottenere una miscela di 2*R*,3*R*-BD e meso-BD con un forte eccesso di quest'ultimo.

In generale è stato notato che anche batteri del genere *Bacillus* portano ad una miscela di solo due dei tre possibili stereoisomeri ed è stata proposta nel 1986 come origine della forma meso (2*S*,3*R*-BD) la riduzione di *S*-acetoino a sua volta derivante dal diacetile, il tutto catalizzato da una deidrogenasi (diacetil reduttasi) NADPH dipendente⁷. Successivamente diversi studi incentrati sulle vie metaboliche responsabili della produzione di questo metabolita hanno proposto due possibili vie (Schema 7), una avente come punto di partenza il piruvato derivante dalla glicolisi⁸ e l'altra il diacetile⁹ (DAC).



Schema 7. Vie metaboliche per la produzione di 2,3-butandiolo

Nel percorso che prende in considerazione la via catabolica il punto di partenza è la condensazione di due molecole di piruvato provenienti dalla glicolisi catalizzata dall'enzima *α -acetolattato sintasi* (a) per formare l' α -acetolattato. Tale prodotto viene successivamente convertito in acetoino (AC) con eliminazione di CO_2 per opera di un secondo enzima, l' *α -acetolattato decarbossilasi* (b).

Ottenuto l'acetoino si possono considerare due diverse vie che portano al butandiolo. La prima, quella indicata col nome di via catabolica, porta direttamente al diolo per via di una riduzione (spesso reversibile) catalizzata da una o più *acetoino reductasi* (c). Questo percorso è quello proposto in bibliografia per i batteri *Bacillus polymixa*⁷ e *Klebsiella pneumoniae*¹⁰. La seconda via, nominata ciclo del butandiolo e riscontrata per la prima volta nel 1998 nel batterio *Bacillus cereus* YUF-4⁹, indica come punto di partenza l'ossidazione dell'acetoino a diacetile (DAC). Questo passaggio oggi è ipotizzato da molti autori come punto di partenza di questa seconda via, ma nessuno studio è stato ancora in grado di descriverlo nello specifico.

Il diacetile formato viene utilizzato in una reazione di condensazione con una molecola di acetaldeide attivata; questo passaggio, catalizzato dall'enzima *acetilacetoino sintasi* (**d**), porta alla formazione dell'acetilacetoino (AAC).

Tale prodotto a sua volta viene ridotto per opera di una *acetilacetoino riduttasi* (**e**) NAD⁺ o NADP⁺ dipendente ad acetilbutandiolo (ABD), che di seguito viene convertito dall'enzima *acetilbutandiolo idrolasi* (**f**) a 2,3-butandiolo liberando una molecola di acetato.

1.2. Produzione di 2,3-butandiolo: fonti di carbonio, condizioni operative e recupero del prodotto

Gli studi effettuati sull'argomento hanno portato alla scoperta di numerose specie batteriche capaci di produrre questo metabolita. I risultati migliori sono stati ottenuti con *Bacillus polymyxa* e *Klebsiella pneumoniae*, che permettono di accumulare in fermentazione con elevata resa il butandiolo e tuttora vengono impiegate per questo scopo in ambito industriale.

Similmente ad altri processi microbici nella produzione di 2,3-butandiolo il glucosio risulta essere la fonte di carbonio più utilizzata^{5,11}. Nel 1948 è stata proposta, come alternativa, l'impiego di un terreno contenente come unica fonte di carbonio lo xilosio, ottenendo butandiolo in discrete quantità utilizzando nella fermentazione *Aerobacter aerogenes*¹².

Recentemente è stato isolato un nuovo ceppo, l'*Enterobacter cloacae* NRRL B-23289, proveniente da materiale ligneo celluloso decomposto, che utilizza come sola fonte di carbonio L-arabinosio e porta all'accumulo di butandiolo in forma meso¹³ con una produttività del processo di 0.63 gr/l h partendo da un terreno contenente 50 gr/l di arabinosio.

Un risultato molto buono è stato ottenuto esprimendo un frammento genetico proveniente da *Klebsiella pneumoniae* IAM 1063 in *Escherichia coli* JM 109. Il prodotto finale della fermentazione risulta essere per l'86% meso-butandiolo e per il 14% di una miscela degli altri due enantiomeri¹⁴. Successivamente si è scoperto che l'aggiunta di glucosio come fonte di carbonio porta unicamente alla produzione di meso-butandiolo¹⁵.

In generale nella produzione fermentativa di 2,3-butandiolo le specie batteriche utilizzano preferenzialmente come fonti di carbonio pentosi o esosi.

Molti pentosi sono stati studiati ed utilizzati per questo tipo di fermentazione e sono stati ottenuti risultati apprezzabili con D-ribosio, D-arabinosio, D-arabitololo e D-lixosio. Inoltre nel 1986 il lattosio è stato utilizzato per la produzione continua di 2,3-butandiolo¹⁶.

Studi condotti all'inizio degli anni novanta hanno considerato numerosi altri carboidrati fra cui saccarosio, fruttosio, glucosio, mannosio e arabinosio come fonti di carbonio

utilizzabili in fermentazioni con *Bacillus polymyxa* ATCC 842 e ATCC 12321, paragonando i risultati sia in base al ceppo utilizzato, sia in base ai diversi prodotti di partenza⁵.

Nel 1998 è stato scoperto che, facendo avvenire la normale fermentazione di glicerolo con *Klebsiella pneumoniae* in condizioni di microaerazione e a pH acido si può ottenere una netta riduzione nella produzione di propandiolo e un consistente accumulo di butandiolo¹⁷.

Considerando fonti di carbonio più complesse è stato testato nel 1997 un processo fermentativo in cui il terreno di coltura era composto prevalentemente da cellulosa derivante dall'idrolisi del granturco¹⁸.

Avvalendosi del batterio *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724 è stato evidenziato il potenziale utilizzo di questo terreno per produrre 2,3-butandiolo; d'altronde tipi di applicazione analoghi erano già stati proposti a metà del 1900 in alcuni studi che indicavano altre matrici lignocellulosiche come materiale fermentabile^{19,20}.

In letteratura sono presenti numerosi articoli in cui si riportano gli studi effettuati per verificare la relazione fra diverse condizioni operative e la resa fermentativa di 2,3-butandiolo.

Numerose ricerche hanno avuto come obiettivo quello d'identificare il reale effetto del pH, dell'aerazione del terreno e della concentrazione dei diversi tipi di carboidrati utilizzati sulla produttività del processo.

Alcuni risultati ottenuti recentemente hanno dimostrato che, fra i vari parametri operativi, la concentrazione iniziale della fonte di carbonio e la percentuale di ossigeno disciolto nel terreno sono quelli che influenzano maggiormente la resa del processo, la produttività e l'eventuale formazione di sottoprodotti²¹.

Nel 1988 è stato condotto uno screening per verificare l'effetto che diverse fonti di carbonio possono avere in una fermentazione. Sono state studiate colture di *Bacillus polymyxa* ATCC 12321 e ATCC 842 fatte crescere in terreni contenenti diversi carboidrati, paragonando in questo modo le rese sia in base allo zucchero di partenza sia in base al diverso ceppo batterico utilizzato⁵.

Studi successivi hanno portato ad evidenziare come un'aggiunta di acido succinico nel terreno di coltura porta un incremento nella resa della fermentazione²² butandiolica, ottenendo un risultato talmente valido da rendere questa applicazione interessante dal

punto di vista industriale. Lo spunto per questa ricerca deriva dal fatto che l'acido succinico si ottiene normalmente come sottoprodotto delle fermentazioni di prodotti ligno-cellulosici, generalmente effettuate con batteri tipo *Fibrobacter succinogens* o *Klebsiella oxytoca*.

Un secondo composto, che favorisce la produttività del processo aumentando l'attività degli enzimi, è l'acetato. Questo prodotto induce la formazione di tre enzimi attivi nel passaggio da piruvato a butandiolo (in particolare dell' α -acetolattato sintasi), ottenendo il massimo risultato quando il pH viene mantenuto a valori leggermente acidi²³.

L'aerazione del terreno è considerata da molti ricercatori il parametro più importante in un processo fermentativo e di conseguenza risulta essere molto ampia la bibliografia a riguardo; un lavoro incentrato sull'effetto dell'ossigenazione del terreno in una coltura di *Klebsiella pneumoniae* ha evidenziato la significativa influenza di quest'ultima sulla concentrazione di 2,3-butandiolo prodotto²⁴.

Altri studi hanno mostrato la diretta dipendenza fra la percentuale di ossigeno disciolto nel terreno e i prodotti della fermentazione. È stato scoperto che valori alti di ossigenazione favoriscono generalmente la crescita cellulare a discapito della produttività del processo. Limitando l'aerazione si ottiene inizialmente acido acetico e successivamente acido lattico, etanolo, acetoino e butandiolo; arrivando in condizioni anossiche come prodotti maggioritari della fermentazione rimangono generalmente etanolo e 2,3-butandiolo in quantità equimolare, con la presenza di una piccola aliquota di acetoino.

In bibliografia sono descritti inoltre casi in cui la percentuale di ossigeno disciolto è in grado di influenzare direttamente la purezza ottica del butandiolo prodotto. Infatti aumentando l'aerazione del terreno di coltura di *Paenibacillus polymyxa* è stata evidenziata una netta diminuzione della quantità di 2R,3R-butandiolo e un relativo aumento della forma meso²⁵.

Un aspetto molto studiato nella produzione di 2,3-butandiolo riguarda le metodologie di recupero del prodotto. A questo passaggio sono legati numerosi problemi vista l'elevata idrofilicità del metabolita. Le tecniche più utilizzate attualmente sono la preevaporazione, la distillazione con membrane a pressione atmosferica e sotto vuoto e l'estrazione con solvente.

Nel caso della preevaporazione si ha una diffusione selettiva attraverso una membrana non porosa, che permette il recupero dei metaboliti basandosi sulla diversa concentrazione dei componenti del terreno.

La distillazione su membrana invece è legata al passaggio dei composti allo stato gassoso attraverso una membrana porosa idrofobica; in questo caso l'efficienza della separazione dipende direttamente del gradiente di temperatura che si forma fra la membrana stessa e la superficie di condensazione.

I principi di queste due tecniche di estrazione vengono parzialmente combinate nel caso della distillazione su membrane a pressione ridotta; questa metodologia si basa sul fatto che, utilizzando una membrana microporosa di politetrafluoroetilene viene permessa solo la diffusione del vapor d'acqua, mentre i prodotti fra cui anche il 2,3-butandiolo non riescono a passare e si concentrano²⁶.

Nonostante queste tecniche possano essere utilizzate anche in processi di produzione continua dei metaboliti, attualmente il metodo più impiegato per il recupero di butandiolo è l'estrazione con solvente. Nel secolo scorso sono stati effettuati numerosi studi per trovare la tipologia di solvente più adatta per questo scopo. I risultati migliori sono stati ottenuti impiegando etere etilico o etile acetato, abbinando l'estrazione all'effetto "salting-out" ottenuto saturando la fase acquosa con cloruro di potassio²⁷.

Infine bisogna considerare che anche l'utilizzo di un sistema di strippaggio del terreno con vapore in controcorrente viene considerata una tecnica utilizzabile per il recupero del butandiolo, ma trova applicazioni reali solo in impianti di grandi dimensioni²⁸.

1.3. *Bacillus stearothermophilus*

Bacillus stearothermophilus è un batterio a bastoncino gram-positivo appartenente al phylum Firmicutes (Figura 1).

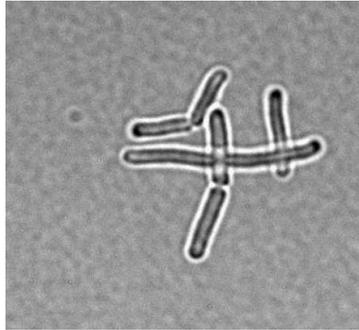


Figura 1. Foto di *Bacillus stearothermophilus*

Questo microrganismo è particolarmente presente nel terreno, nei fondali oceanici e nelle sorgenti di acqua calda. Inoltre spesso lo si può trovare nei cibi, dove rappresenta una delle principali cause di sporulazione; proprio per tale caratteristica e per la sua resistenza alle alte temperature viene utilizzato in microbiologia come indicatore di sterilità.

Una caratteristica importante di *B. stearothermophilus* risiede nel fatto che questo batterio è un termofilo obbligato in grado di moltiplicarsi in un intervallo di temperatura di 37-75°C, con un optimum di crescita compreso fra i 55°C e i 65°C.

Le prime applicazioni del batterio in ambito biotecnologico risalgono alla seconda metà del novecento e riguardano la capacità del microorganismo di produrre in elevata quantità una α -amilasi rilasciata nel brodo di coltura²⁹ e la relazione fra le diverse fonti di carbonio presenti nel terreno e la resa in produzione dell'enzima.

Ulteriori applicazioni sono state proposte all'inizio degli anni novanta, dimostrando che *B. stearothermophilus* poteva svolgere un ruolo da biocatalizzatore di reazioni ossidoriduttive. Infatti da questo microrganismo è stata estratta e purificata una lattato deidrogenasi capace di ridurre β -chetoacidi nei corrispettivi alcol in maniera enantioselettiva³⁰.

Anche nel gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio periodo di dottorato sono stati effettuati numerosi studi riguardanti le possibili applicazioni biocatalitiche di *B. stearothermophilus*.

I primi lavori hanno dimostrato la capacità di utilizzare le cellule di questo batterio per ossidare miscele racemiche di alcol biciclici³¹ o arilici³², ottenendo come risultato delle buone rese ed un'elevata purezza ottica dei prodotti di reazione.

Questi primi risultati sono stati seguiti da studi che hanno portato all'utilizzo delle cellule di *B. stearothermophilus* come catalizzatori di reazioni effettuate in solventi organici³³ e a studi volti alla purificazione di un enzima presente all'interno delle cellule³⁴, nominato successivamente diacetilreduttasi, e applicato come tale in ambito biocatalitico¹.

Studi molto recenti hanno inoltre portato alla scoperta e all'isolamento di una DNA-polimerasi presente all'interno del batterio, che ha successivamente trovato applicazione in campo biomolecolare viste le sue capacità di separare le doppie eliche di DNA, mantenendo la propria attività fino a temperature elevate (70°C)³⁵. Questo enzima può essere impiegato nell'amplificazione polimerasica a catena (PCR), permettendo di lavorare però a temperature più basse rispetto alle tecniche tradizionali (circa 96-99°C), e quindi meno dannose per la degradazione del DNA.

2. PROGETTO

Nel laboratorio dove ho svolto il dottorato di ricerca *Bacillus stearothermophilus* è stato ampiamente utilizzato come catalizzatore di reazioni enantioselettive, ottenendo risultati interessanti nella risoluzione di miscele racemiche di alcol^{31,32}. Successivamente è stato purificato l'enzima responsabile di questi processi, identificato come una diacetile(acetoino)reduttasi, impiegato di seguito in una serie di riduzioni enantioselettive di dicetoni prochirali³⁵.

La mia tesi di dottorato ha riguardato lo studio delle fermentazioni condotte con *Bacillus stearothermophilus* ATCC2027 in quanto l'analisi del brodo di coltura in cui il batterio veniva fatto crescere in presenza di un'elevata concentrazione di saccarosio (40 gr/l) aveva evidenziato la presenza di 2,3-butandiolo in discreta quantità.

Una volta individuata la natura di questo metabolita è stato preso come obiettivo iniziale del mio lavoro quello di effettuare un'indagine per verificare la quantità reale di 2,3-BD che *B. stearothermophilus* era in grado di produrre metabolizzando il saccarosio, passando successivamente ad uno screening riguardante altre tipologie di mono- e disaccaridi utilizzabili in questo processo come fonti di carbonio.

Trattandosi di uno studio preliminare la scelta dei diversi substrati zuccherini è stata compiuta con la consapevolezza che le soluzioni pure di zucchero, data la loro antieconomicità, possono essere impiegate solo in laboratorio in fase di ricerca. Per questo motivo sono stati presi in esame inizialmente solo i saccaridi più comuni, facendo particolare attenzione a quelli maggiormente presenti in matrici naturali complesse e in sottoprodotti derivanti dall'industria o da lavorazioni agricole.

Il passo successivo è stato quello di testare le capacità fermentative direttamente utilizzando matrici più complesse, delineando così una possibile applicazione industriale del processo studiato.

In particolare è stata verificata la possibilità di utilizzare il melasso di canna come terreno in cui fare avvenire la fermentazione. L'utilizzo di questo prodotto senza aggiunte di altri nutrienti è possibile in quanto la composizione media del melasso contiene tutti i componenti utili per la crescita di un microrganismo (fonti di carbonio e azoto, vitamine e sali).

I risultati ottenuti in campo fermentativo hanno spinto la ricerca verso uno studio strettamente biochimico del batterio, riguardante la via metabolica responsabile della

produzione di 2,3-butandiolo e del suo precursore acetoino (AC). Questa tematica è stata sviluppata cercando di verificare similitudini o divergenze con caratteristiche già descritte in altri batteri produttori di questi metaboliti^{9,37}. Il primo passaggio ha riguardato la determinazione della configurazione dell'acetoino prodotto a partire dal piruvato, proseguendo poi con la ricerca degli enzimi in grado di catalizzare la riduzione di AC a 2,3-BD. Infine è stata verificata la presenza nel pool enzimatico di *B. sterothermophilus* di una seconda via di produzione di butandiolo, identificata in letteratura per la prima volta nel *Bacillus cereus* YUF-4 e nominata come “ciclo del butandiolo”.

Come conclusione degli studi riguardanti questo batterio sono state verificate le capacità biotrasformative di una acetilacetoino sintasi presente in *B. sterothermophilus*. L'attività di questo enzima nel catalizzare la formazione di legami carbonio-carbonio partendo da due molecole di diacetile (DAC) ha spinto l'interesse verso la ricerca di altri dichetoni utilizzabili come substrato, in modo da ottenere prodotti di condensazione con strutture più complicate ed interessanti dal punto di vista chimico, visto che gli α -idrossi- β -dichetoni sono intermedi difficilmente ottenibili con le normali tecniche di sintesi organica.

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1. Materiali

Il *Bacillus stearothermophilus* ATCC2027 è reperibile presso l'American Type Culture Collection. I componenti dei terreni di coltura, saccarosio, glucosio, fruttosio, galattosio, xilosio, maltosio, cellobiosio, bactopectone ed estratto di lievito sono commercializzati da Oxoid o Fluka.

Acetofenone, acido 3,5-dinitrosalicilico, tartrato di sodio e di potassio, fenolo, acetoino, 2,3-butandiolo (sia in miscela di isomeri che nelle sue forme pure D ed L), K_2SO_4 , KH_2PO_4 , $NaH_2PO_4 \cdot 6H_2O$, Na_2SO_4 anidro, $NaBH_4$, fenilmetilsulfonil-fluoruro, β -mercaptoetanolo, EDTA, e formiato di sodio sono prodotti Fluka mentre diacetile, NAD^+ , e NADH sono prodotti Sigma.

Gli enzimi, lisozima e formiato deidrogenasi da *Candida boidinii*, sono prodotti Sigma-Aldrich, mentre l'invertasi è prodotta da Fluka.

Le resine cromatografiche DEAE-sepharose e Cibacron Blue 3GA-Agarose sono commercializzate da Sigma e le membrane per ultrafiltrazione sono Amicon Ultra-4/Ultracel 10K, commercializzate da Millipore.

Le analisi gascromatografiche sono state eseguite con uno strumento Carlo Erba modello HG-600 equipaggiato con una colonna capillare chirale con fase stazionaria composta da dimetil-*n*-pencil- β -ciclodestrine su OV 1701 e con un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).

Gli spettri 1H NMR sono stati acquisiti con uno spettrometro Varian modello Gemini-300 utilizzando tetrametilsilano come standard e $CDCl_3$ come solvente.

Le analisi spettrofotometriche sono state eseguite utilizzando uno strumento Thermo Spectronic modello Helios.

3.2 Metodi

3.2.1 Conservazione del microrganismo

Bacillus stearothermophilus ATCC2027 è stato conservato a -80°C in azoto liquido. Le cryovials (1.5 ml di una sospensione di cellule ognuna) sono state preparate miscelando sotto cappa a flusso laminare 12 g di glicerina sterile con 45 ml di una coltura del batterio cresciuta 24 ore a 39°C e 120 r.p.m. in terreno TY composto da glucosio (10 g/l), triptone (10 g/l), estratto di lievito (2.5 g/l) e KH₂PO₄ (0.2 g/l).

3.2.2 Determinazione della crescita cellulare

La crescita cellulare, espressa in g/l, è stata stimata misurando l'assorbanza a 660 nm e mettendola in relazione con una curva di calibrazione costruita con i valori di assorbanza e peso secco di campioni di fermentazione prelevati a tempi diversi. Il peso secco è stato determinato eliminando la parte liquida dai campioni per centrifugazione e seccando la biomassa per 24 ore a 115°C.

Abs (660 nm)	Peso secco (g/l)
0,36	0,2
6,38	2,40
6,73	2,67
15,28	5,65

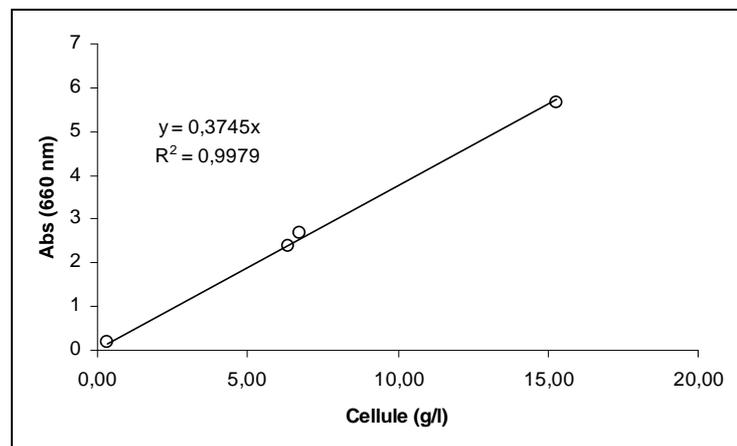


Grafico 1. Curva di calibrazione per crescita cellulare

$$\text{Cellule (g/l)} = \text{Abs (660 nm)} / 0.3745$$

3.2.3. Determinazione della concentrazione di acetoino

La determinazione è stata eseguita per analisi gascromatografica in presenza di acetofenone come standard interno. La curva di calibrazione è stata ottenuta analizzando gli estratti organici ottenuti trattando soluzioni acquose di acetoino (2 ml) a concentrazione nota (30 g/l, 20 g/l, 10 g/l). Ogni soluzione è stata saturata con NaCl (0.2 g) ed estratta con etile acetato (0.8 ml) contenente acetofenone (0,4% p/v) come standard interno. La fase organica viene poi separata da quella acquosa, anidrificata con Na₂SO₄ anidro ed analizzata via GLC. L'analisi quantitativa è stata eseguita iniettando l'estratto organico (1 µl) ed utilizzando una programmata da 90°C–200°C (2°C/min): carrier gas He (80 Kpascal), una temperatura di iniezione di 200°C e di rivelazione di 250°C. La curva di calibrazione è stata costruita riportando in ascissa la concentrazione in g/l delle soluzioni di acetoino e in ordinata il rapporto fra l'area del picco dell'acetoino e quella dell'acetofenone (standard interno) ricavate dal relativo cromatogramma (Grafico 2 e Figura 1).

Per la determinazione della concentrazione di acetoino nelle fermentazioni, i campioni prelevati (2 ml) sono stati centrifugati (6000 r.p.m. per 10 min) ed il supernatante è stato trattato esattamente come le soluzioni a titolo noto utilizzate per la costruzione della curva di calibrazione. Gli estratti organici sono stati analizzati al gascromatografo e dal relativo rapporto tra le aree dei picchi di acetoino ed acetofenone, grazie alla curva di calibrazione è possibile ricavare la concentrazione di acetoino.

Conc bd	Abd/Astd
0,0	0,0
6,4	2,4
12,8	5,2
25,7	9,5

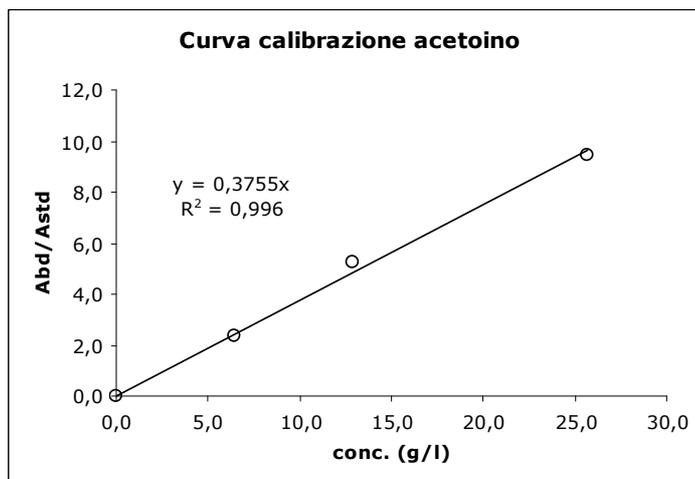


Grafico 2. Curva di calibrazione acetoino

$$\text{Ac (gr/l)} = [\sum \text{Area AC} / \text{Area std}] / 0.3755$$

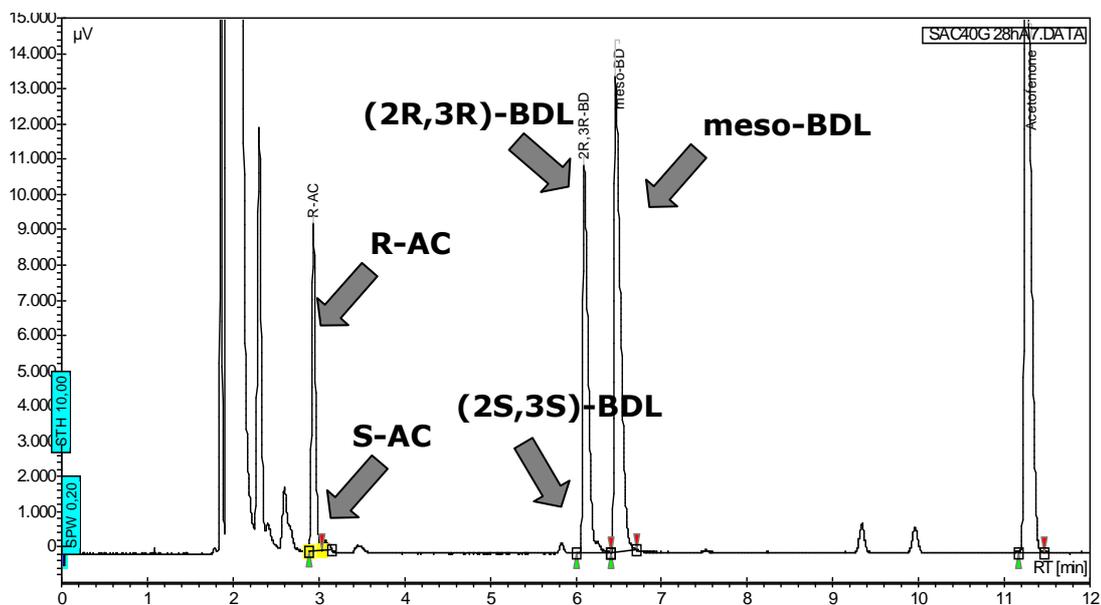


Figura 1. Cromatogramma di 2,3-butandiolo e acetoino

3.2.4. Determinazione della concentrazione di 2,3-butandiolo

La determinazione è stata eseguita per analisi gascromatografica in presenza di acetofenone come standard interno. La curva di calibrazione è stata ottenuta utilizzando la stessa metodica descritta per l'analisi dell'acetoino e così pure la determinazione della concentrazione del 2,3-butandiolo nei campioni di fermentazione (Grafico 3).

Conc bd	Abd/Astd
0,0	0,0
7,3	0,6
14,7	1,1
29,4	2,4

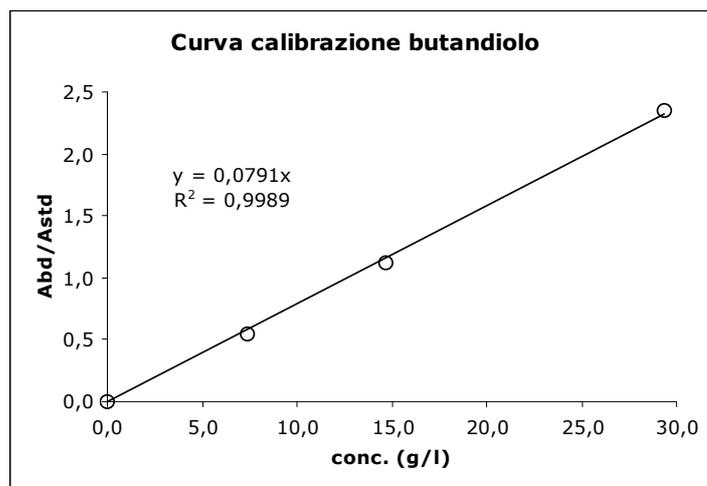


Grafico 3. Curva di calibrazione 2,3-butandiolo

$$BD \text{ (g/l)} = [\sum \text{Area BD} / \text{Area std}] / 0.0791$$

3.2.5 Determinazione degli zuccheri residui in fermentazioni di zuccheri riducenti

La determinazione è stata eseguita sfruttando un metodo colorimetrico basato sull'utilizzo di un reattivo a base di acido 3,5-dinitrosalicilico (DNSA) composto da una soluzione acquosa di NaOH (10 g/l), acido 3,5-dinitrosalicilico (10 g/l), fenolo (0.2 g/l), sodio tiosolfato (500 g/l) e sodio potassio tartrato (200 g/l).

La curva di calibrazione viene costruita preparando tre soluzioni acquose dello zucchero in esame a varie concentrazioni (30 g/l, 20 g/l e 10 g/l). Ogni soluzione standard (50 µl) viene miscelata con il reattivo a base di DNSA (1 ml) all'interno di una provetta con tappo a vite. Le miscele sono scaldate in un bagno a 100°C per 5 min quindi lasciate a temperatura ambiente (20°C per 20 min) dopo di che ne viene letta l'assorbanza a 540 nm. La curva di calibrazione viene ottenuta mettendo in grafico i valori di assorbanza (ordinata) in funzione della concentrazione di zucchero (ascissa).

L'analisi degli zuccheri residui nei campioni di fermentazione si ottiene centrifugando il campione (6000 r.p.m. per 10 min) e trattando il supernatante (eventualmente diluito con acqua distillata) come descritto per le soluzioni standard. Dall'assorbanza misurata a 540 nm, grazie alla curva di calibrazione (e tenendo conto dell'eventuale diluizione) sarà possibile determinare la concentrazione dello zucchero.

3.2.6 Determinazione degli zuccheri residui nelle fermentazioni di saccarosio

Anche in questo caso la determinazione è stata eseguita sfruttando il metodo colorimetrico dell'acido 3,5-dinitrosalicilico, ma essendo esso tale metodo specifico per zuccheri riducenti, è stato necessario procedere preventivamente all'idrolisi del saccarosio mediato dall'enzima invertasi.

La curva di calibrazione è stata costruita preparando tre soluzioni acquose di saccarosio a varie concentrazioni (30 g/l, 20 g/l e 10 g/l). Ad ogni soluzione standard (50 µl) viene aggiunto tampone acetato 50 mM a pH 4.5 (400 µl) ed invertasi (50 µl di una soluzione all'1% p/v). Le miscele così ottenute sono state incubate per 1 h a 30°C e quindi ad ognuna viene aggiunto il reattivo a base di DNSA (1 ml). L'analisi viene eseguita come riportato in precedenza per gli zuccheri riducenti.

3.3. Fermentazioni

3.3.1 Procedura generale

Tutte le prove di fermentazione sono state condotte utilizzando beute da 250 ml contenenti 100 ml di terreno sterile composto dallo zucchero scelto come fonte di carbonio a concentrazione variabile e da bactopectone (20 g/l), estratto di lievito (10 g/l), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (6.8 g/l) e K_2SO_4 (2.6 g/l). L'inoculo è stato eseguito aggiungendo ai terreni una precoltura (5 ml) cresciuta 24 ore a 39°C e 120 r.p.m. in un terreno identico al precedente utilizzando come fonte di carbonio saccarosio (40 g/l). Le fermentazioni sono state incubate nelle stesse condizioni di temperatura ed agitazione impiegate per la precoltura e da esse sono stati prelevati i campioni sui cui sono state determinate le concentrazioni di biomassa, acetoino, butandiolo e zuccheri residui seguendo le metodiche precedentemente descritte.

3.3.2. Fermentazione con saccarosio (40 g/l)

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)	Saccarosio residuo (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00	40,00
2	2,55	0,53	0,10	36,00
4	3,23	0,69	0,18	29,24
6	3,50	1,53	0,23	26,40
8	3,64	2,36	0,25	22,41
12	3,68	4,16	0,28	15,51
24	3,29	11,11	0,53	6,59
26	3,31	14,66	0,42	5,61
28	3,29	17,72	0,76	4,17
32		19,81	1,17	4,78
36		19,42	1,37	4,37
48		15,63	4,40	4,71
52		14,88	5,28	4,68
56		13,63	5,28	4,60
60		13,21	8,72	4,50

Tabella 1. Fermentazione con saccarosio (40 g/l)

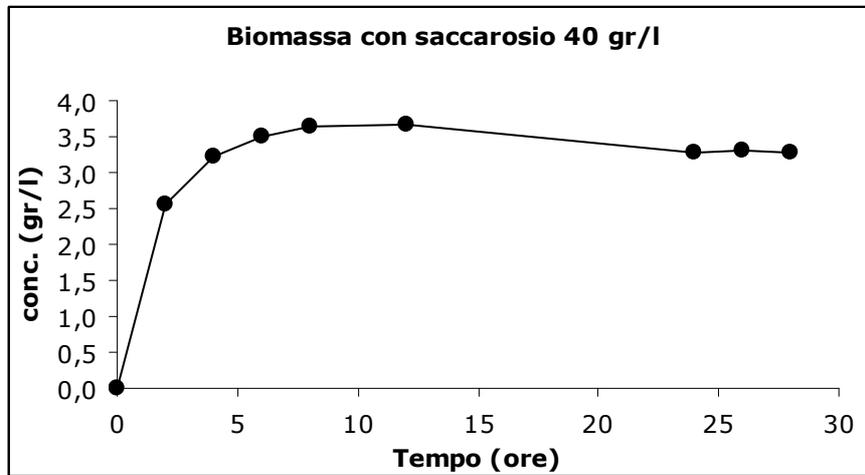


Grafico 4. Andamento della biomassa nella fermentazione con saccarosio (40 g/l)

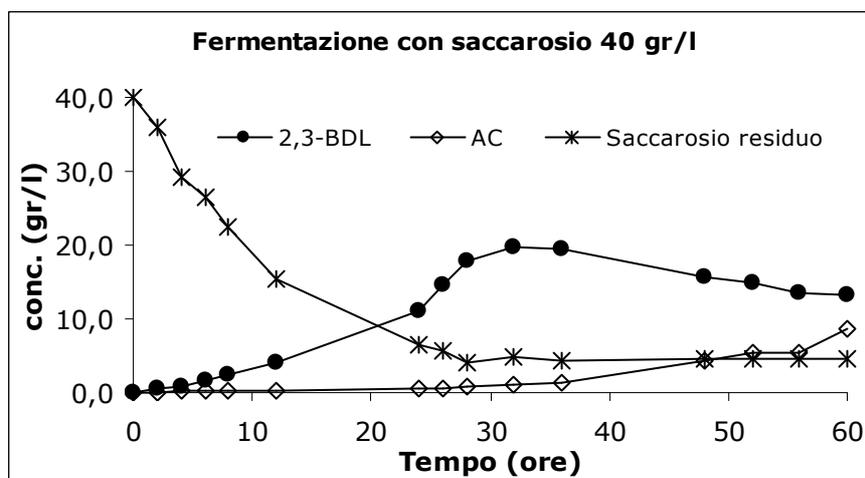


Grafico 5. Fermentazione con saccarosio (40 g/l)

3.3.3. Fermentazione con saccarosio (30 g/l)

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)	Saccarosio residuo (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00	30,00
2	2,40	1,40	0,18	29,60
4	3,00	2,58	0,43	29,00
6	3,30	3,40	0,41	26,60
8	3,50	4,57	0,43	24,50
12	3,70	7,85	0,64	20,90
24	3,60	16,61	0,89	8,00
26	3,60	16,82	1,13	5,80
28	3,60	16,98	1,81	3,70
32		16,67	3,51	3,00
36		14,28	5,52	2,70
48		9,12	12,04	1,90
52		7,32	13,10	1,50
56		7,70	13,44	1,10
60		8,36	13,19	1,00

Tabella 2. Fermentazione con saccarosio (30 g/l)

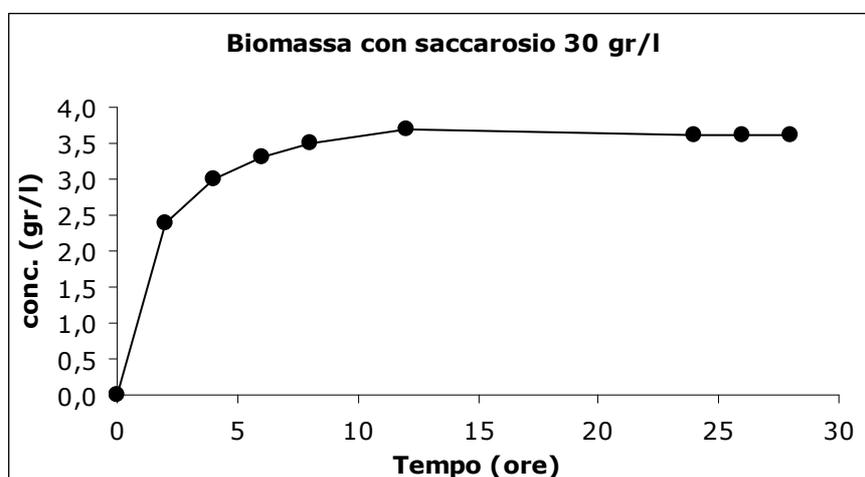


Grafico 6. Andamento della biomassa fermentazione con saccarosio (30 g/l)

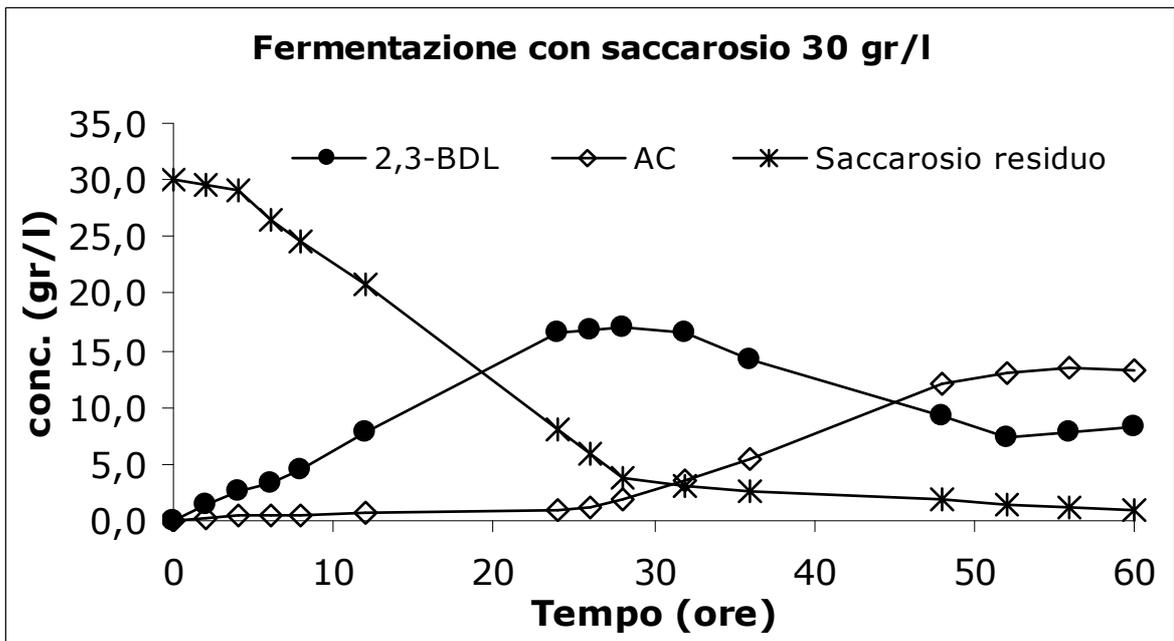


Grafico 7. Fermentazione con saccarosio (30 g/l)

3.3.4. Fermentazione con saccarosio (20 g/l)

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)	Saccarosio residuo (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00	20,00
2	1,99	0,80	0,40	18,10
4	2,88	2,57	0,61	13,60
6	3,17	2,70	0,60	10,30
8	3,37	3,20	0,54	8,10
12	3,56	3,90	0,88	6,80
24	3,64	9,97	2,47	1,20
26	3,64	9,78	3,40	1,20
28	3,63	9,35	4,65	1,00
32		6,44	5,73	0,00
36		4,31	7,82	0,00
48		3,70	11,59	0,00
52		2,91	11,10	0,00
56		2,80	11,07	0,00

Tabella 3. Fermentazione con saccarosio (20 g/l)

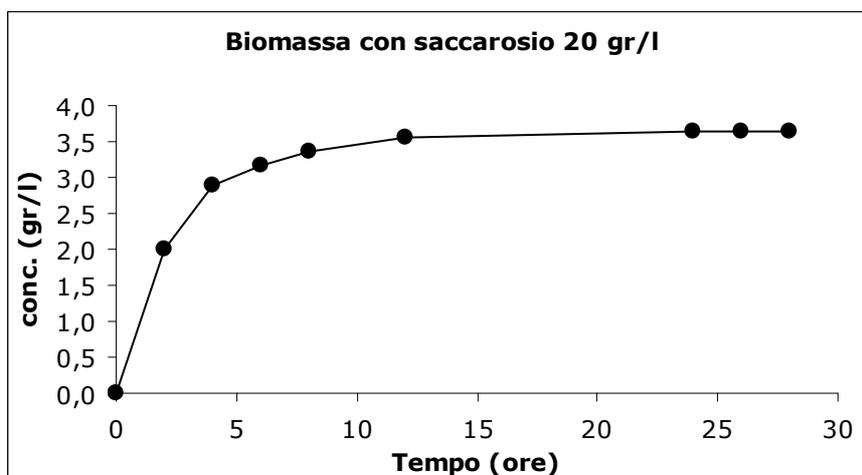


Grafico 8. Andamento della biomassa nella fermentazione con saccarosio (20 g/l)

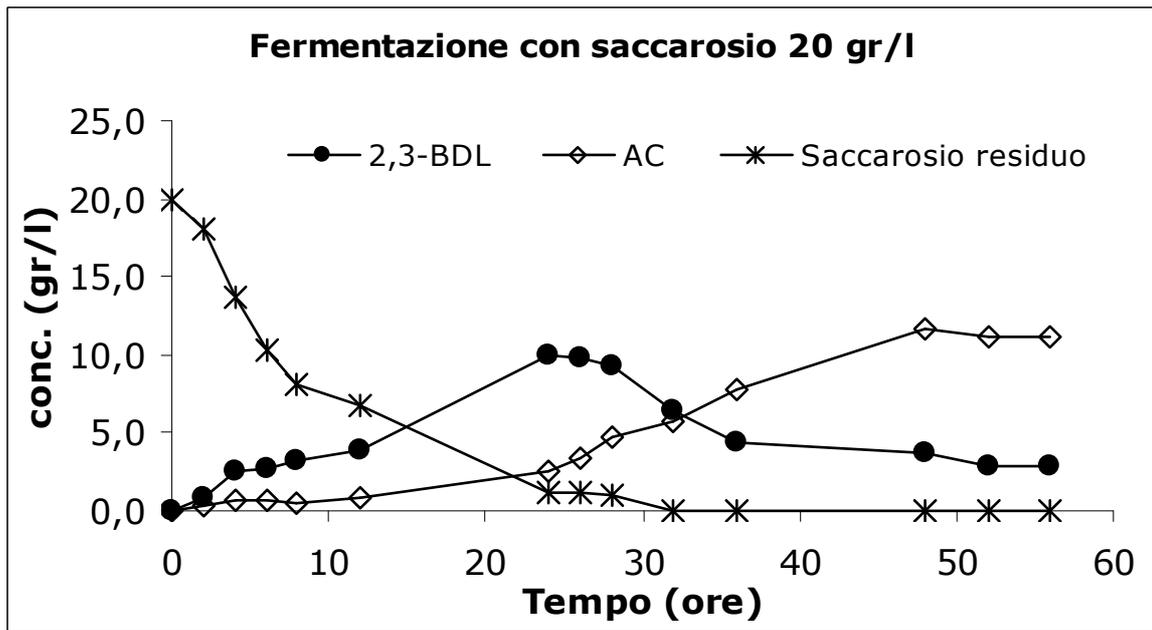


Grafico 9. Fermentazione con saccarosio (20 g/l)

3.3.5. Fermentazione con saccarosio (10 g/l)

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)	Saccarosio residuo (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00	10,00
2	1,91	0,60	0,30	9,00
4	2,69	2,80	0,60	8,50
6	3,08	4,70	0,60	7,30
8	3,29	5,40	0,50	6,10
12	3,42	4,90	0,60	4,20
24	3,40	2,40	4,70	1,10
26		2,30	5,80	1,00
28		2,30	7,30	1,00
32		1,00	8,00	0,00
36		0,70	8,90	0,00
48		1,20	8,20	0,00

Tabella 4. Fermentazione con saccarosio (10 g/l)

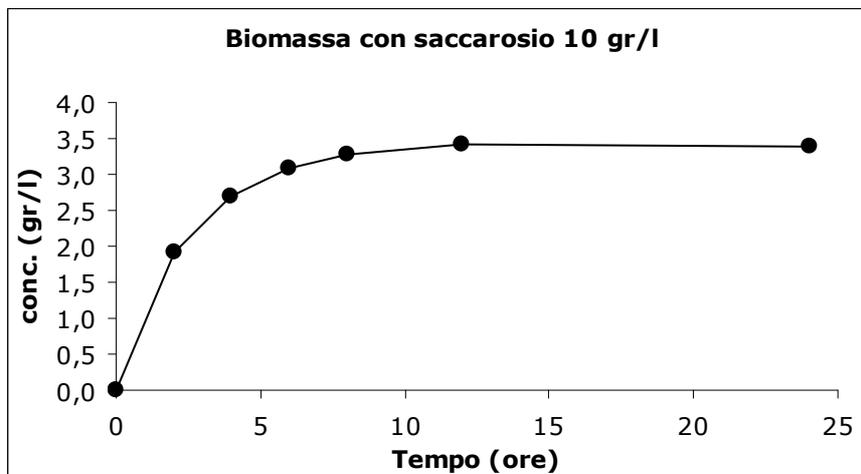


Grafico 10. Andamento della biomassa nella fermentazione con saccarosio (10 g/l)

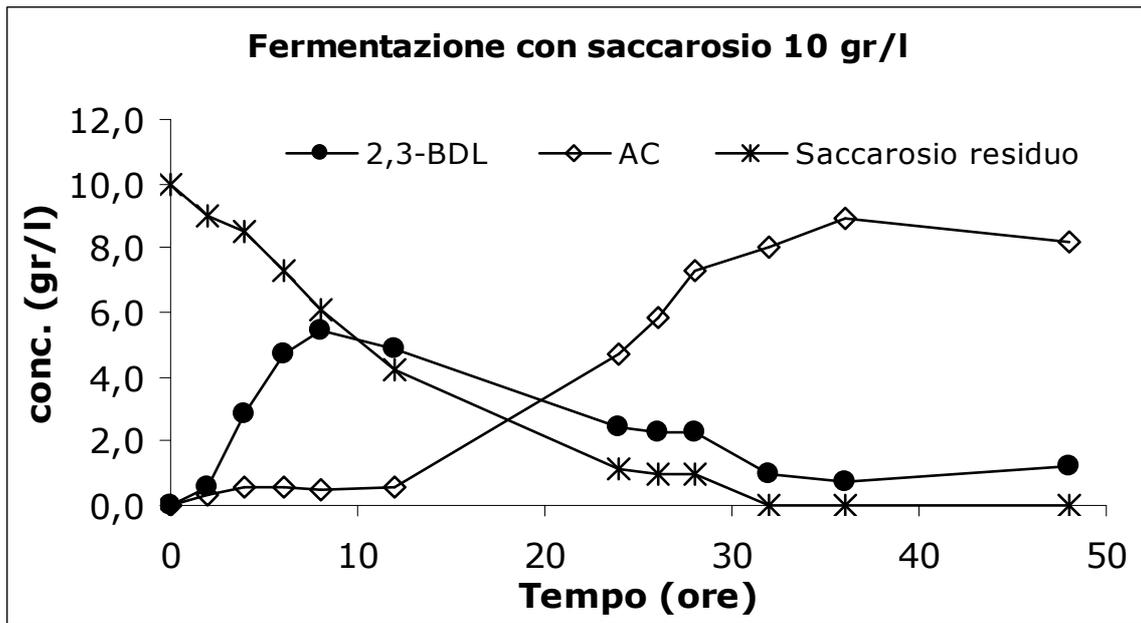


Grafico 11. Fermentazione con saccarosio (10 g/l)

3.3.6. Fermentazione senza fonti di carbonio

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00
4	0,58	0,10	0,19
8	1,00	0,16	0,81
12	1,47	0,17	1,08
24	1,71	0,12	1,03
28	1,98	0,15	0,94
32	2,21	0,13	0,77
48	1,90	0,09	0,30
60		0,05	0,21

Tabella 5. Fermentazione senza fonte di carbonio

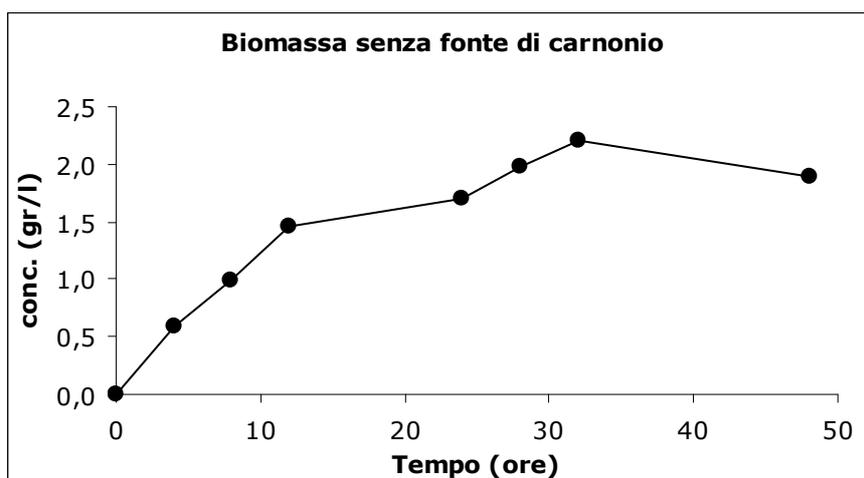


Grafico 12. Andamento della biomassa nella fermentazione senza fonte di carbonio

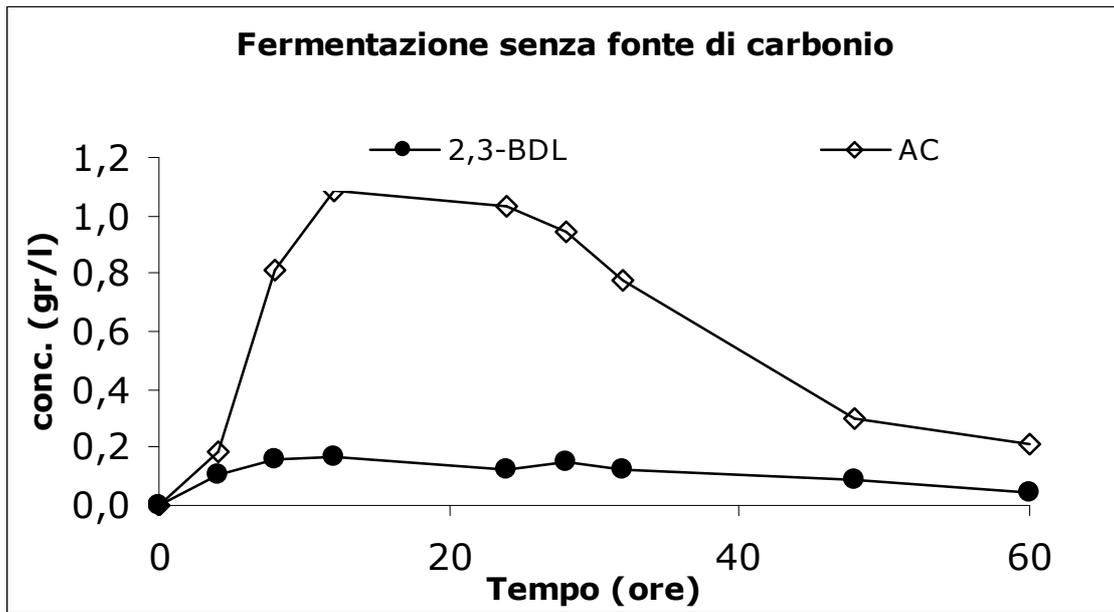


Grafico 13. Fermentazione senza fonte di carbonio

3.3.7. Fermentazione con lattosio (30 g/l)

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)	Lattosio residuo (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00	30,00
3	1,50	0,16	0,20	30,00
7	2,70	0,23	0,30	28,90
15	3,20	0,24	0,30	27,60
22	3,50	0,24	0,40	27,00
27	3,50	0,33	0,50	27,00
33	3,60	0,32	0,50	26,60
43	3,60	0,41	0,60	22,90
48	3,60	0,42	0,70	23,20
54	3,60	0,41	0,80	21,30

Tabella 6. Fermentazione con lattosio (30 g/l)

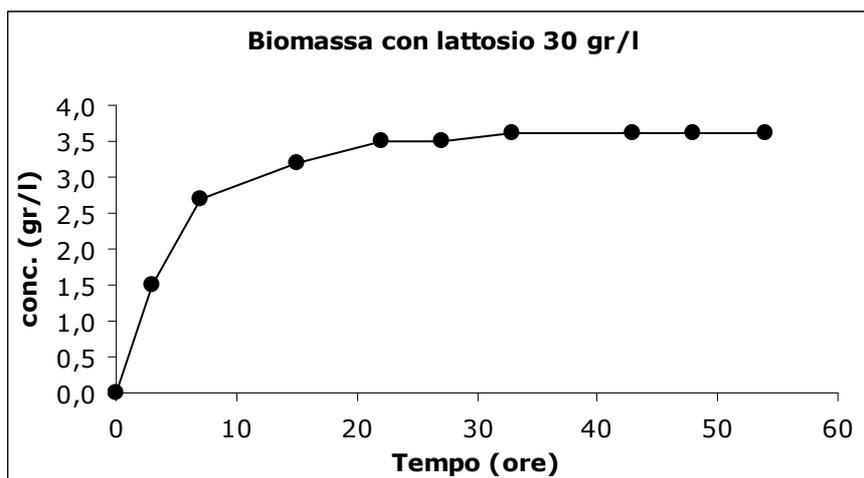


Grafico 14. Andamento della biomassa nella fermentazione con lattosio (30 g/l)

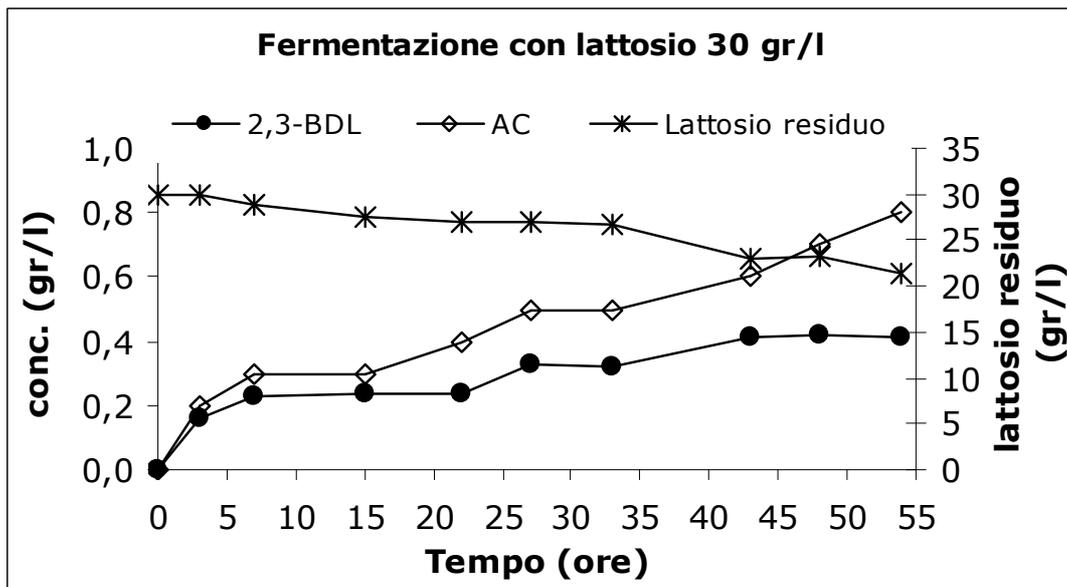


Grafico 15. Fermentazione con lattosio (30 g/l)

3.3.8. Fermentazione con maltosio (30 g/l)

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)	Maltosio residuo (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00	30,00
3	1,70	0,10	0,30	29,20
6	2,60	0,24	0,40	29,00
8	2,80	0,31	0,40	28,70
16	3,20	0,72	0,70	28,70
23	3,00	0,93	1,10	28,60
31	2,90	0,17	1,80	27,00
33	2,90	0,10	1,90	26,70
40	3,00	0,10	1,80	26,30
48	2,80	0,15	1,70	25,70
52	2,80	0,10	1,60	23,80
55	2,60	0,21	1,60	22,80

Tabella 7. Fermentazione con maltosio (30 g/l)

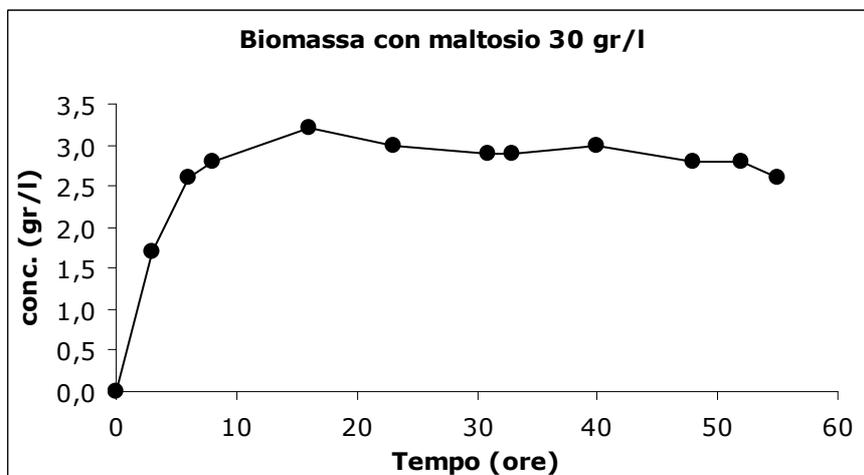


Grafico 16. Andamento della biomassa nella fermentazione con maltosio (30 g/l)

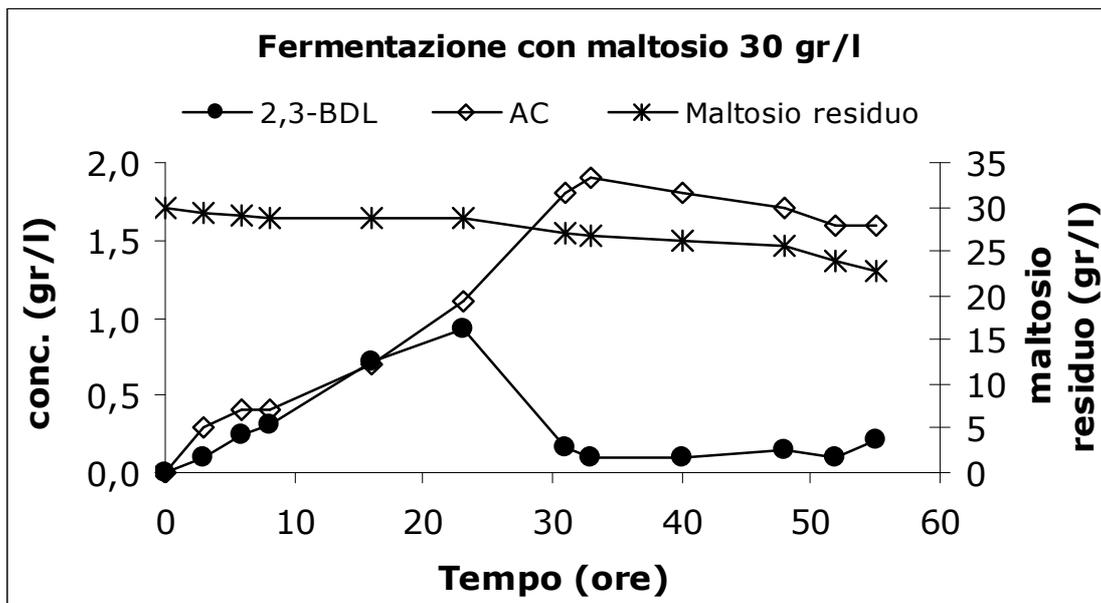


Grafico 17. Fermentazione con maltosio (30 g/l)

3.3.9. Fermentazione con cellobiosio (30 g/l)

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)	Cellobiosio residuo (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00	30,00
3	1,86	0,40	0,20	29,70
6	2,78	0,40	0,20	29,20
8	2,92	0,50	0,20	29,10
16	3,10	0,60	0,50	27,00
19	3,12	0,60	1,00	27,00
24	3,21	0,60	1,70	27,00
31	2,95	0,70	2,20	27,00
33	2,93	0,70	2,20	26,80
40		0,70	2,30	26,60
44		0,70	2,40	26,30
48		0,80	2,40	25,30
55		0,90	2,70	25,00

Tabella 8. Fermentazione con cellobiosio (30 g/l)

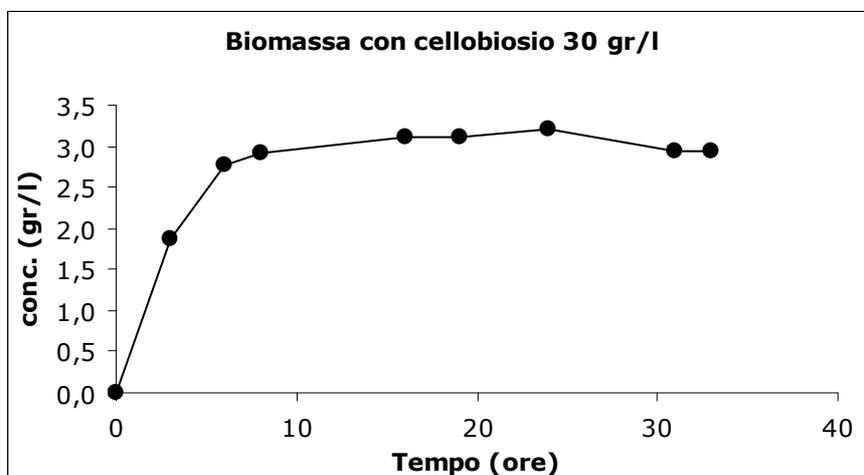


Grafico 18. Andamento della biomassa nella fermentazione con cellobiosio (30 g/l)

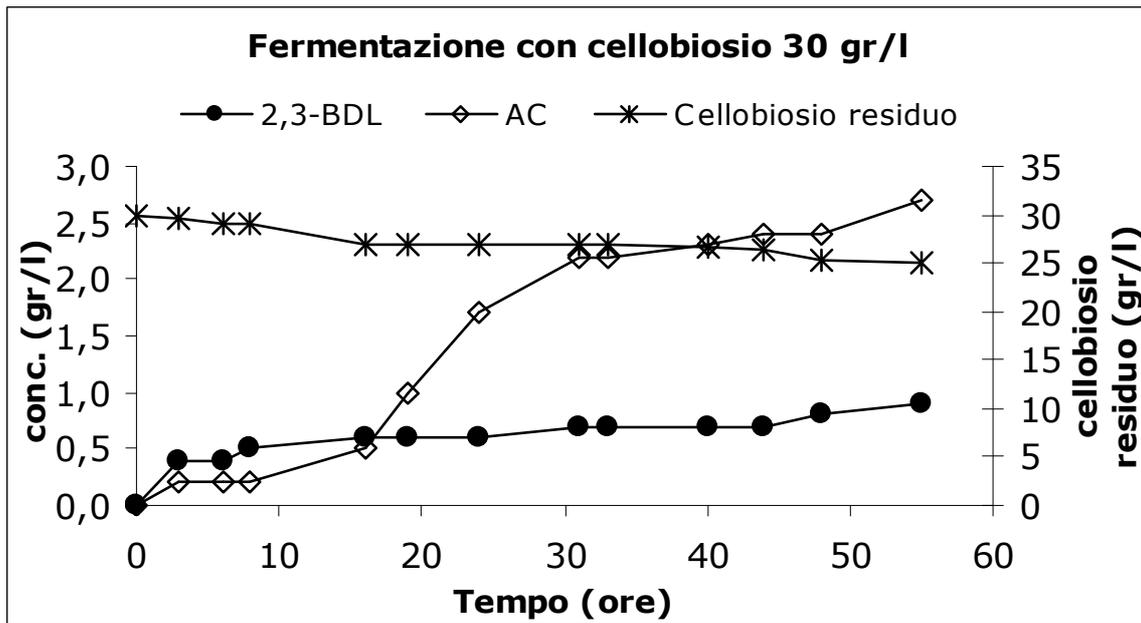


Grafico 19. Fermentazione con cellobiosio (30 g/l)

3.3.10. Fermentazione con galattosio (30 g/l)

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)	Galattosio residuo (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00	30,00
4	1,20	3,28	1,00	29,80
8	2,60	3,52	0,90	29,80
12	2,90	3,21	1,20	29,20
24	3,00	3,38	3,00	28,60
28	2,80	1,59	4,10	28,70
32	2,70	1,40	4,70	28,70
36		1,60	5,20	28,80
48		2,36	6,60	28,80
56		3,65	7,60	28,90
60		3,20	6,70	28,80

Tabella 9. Fermentazione con galattosio (30 g/l)

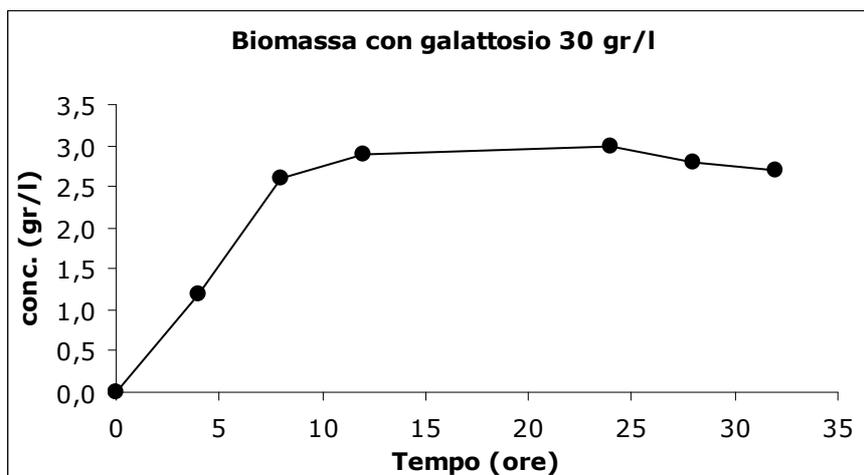


Grafico 20. Andamento della biomassa nella fermentazione con galattosio (30 g/l)

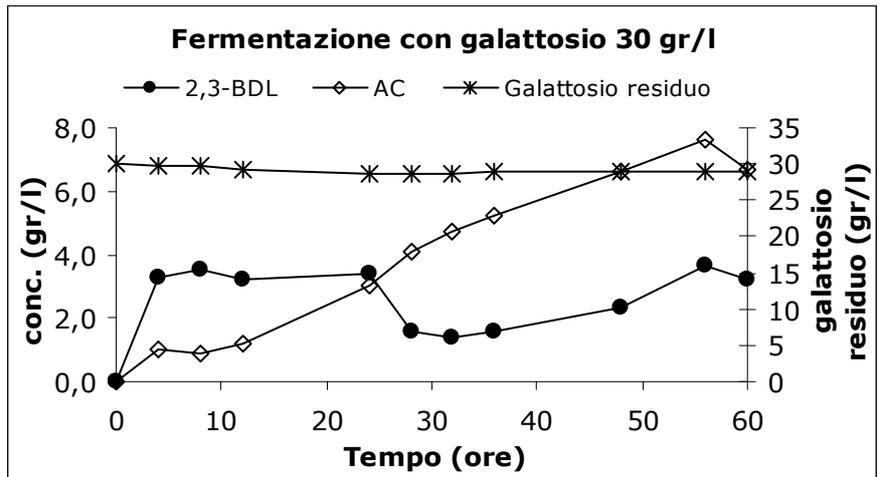


Grafico 21. Fermentazione con galattosio (30 g/l)

3.3.11. Fermentazione con xilosio (30 g/l)

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)	Xilosio residuo (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00	30,00
4	2,20	1,75	2,00	30,00
8	2,30	1,07	3,30	30,00
12	2,40	1,04	3,60	30,00
24	2,90	1,56	4,20	27,40
28	2,80	0,78	4,70	26,50
32	2,60	0,71	5,60	27,00
36	2,30	0,50	5,60	27,00
48		0,42	5,50	26,50
56		0,41	5,50	26,20
60		0,62	5,50	26,20

Tabella 10. Fermentazione con xilosio (30 g/l)

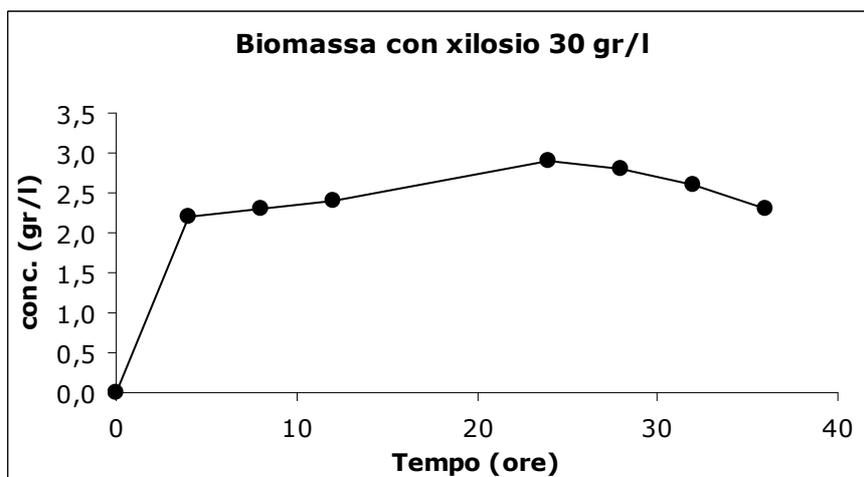


Grafico 22. Andamento della biomassa nella fermentazione con xilosio (30 g/l)

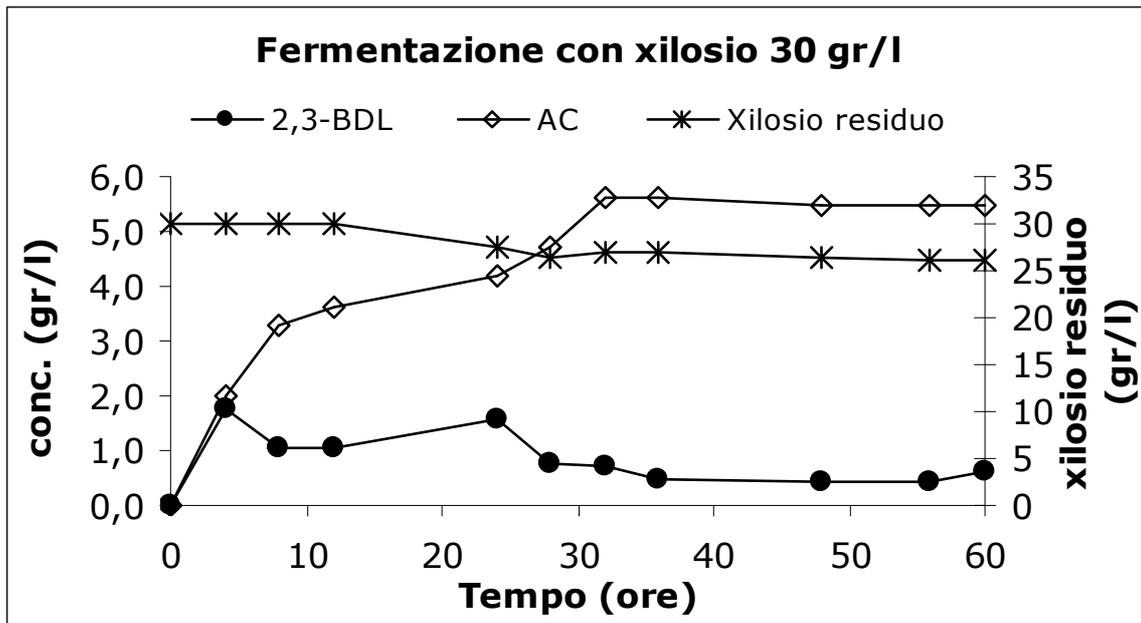


Grafico 23. Fermentazione con xilosio (30 g/l)

3.3.12. Fermentazione con glucosio (30 g/l)

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)	Glucosio residuo (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00	30,00
4	2,76	0,76	0,36	29,38
8	2,86	2,09	0,25	25,68
12	3,09	3,37	0,48	24,22
24	3,65	6,51	1,14	19,71
28	3,58	7,08	1,64	18,78
32	3,55	8,70	2,60	16,08
36		6,63	3,42	16,14
48		4,75	6,70	15,00
56		5,40	7,29	14,80
60		4,91	7,47	14,35

Tabella 11. Fermentazione con glucosio (30 g/l)

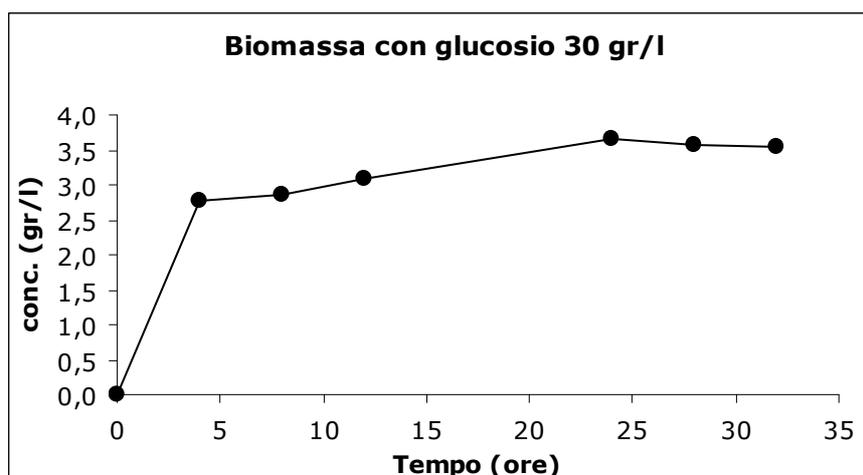


Grafico 24. Andamento della biomassa nella fermentazione con glucosio (30 g/l)

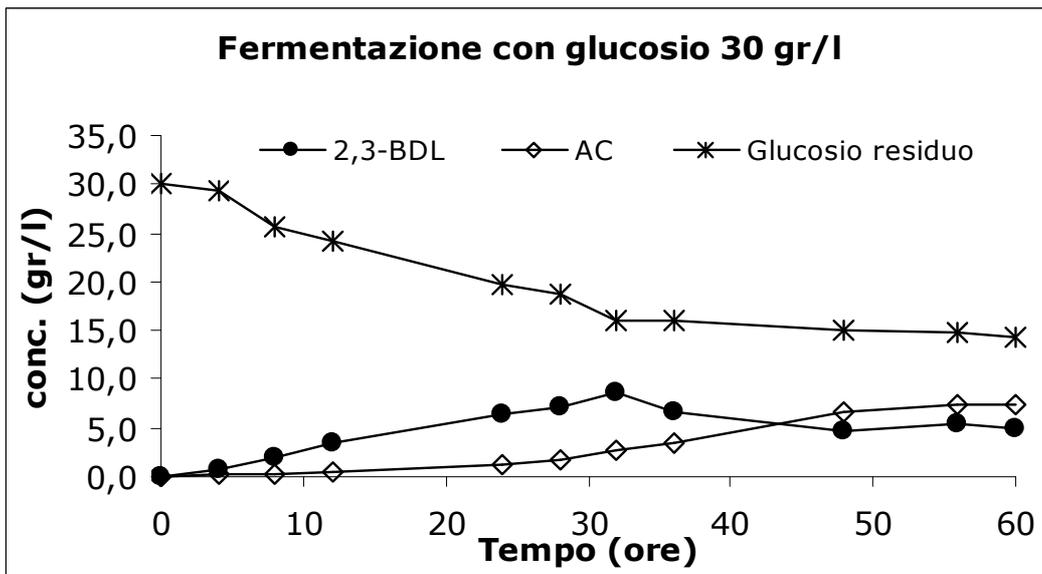


Grafico 25. Fermentazione con glucosio (30 g/l)

3.3.13. Fermentazione con fruttosio (30 g/l)

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)	Fruttosio residuo (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00	30,00
4	2,59	1,04	0,23	26,50
8	3,22	1,70	0,30	25,91
12	3,26	4,00	0,50	22,64
24	3,55	6,28	1,43	16,80
28	3,60	6,00	1,99	17,39
32	3,60	6,95	3,14	17,87
36		7,13	4,50	15,80
48		4,62	7,00	15,00
56		6,83	8,39	14,30
60		4,49	7,76	14,00

Tabella 12. Fermentazione con fruttosio (30 g/l)

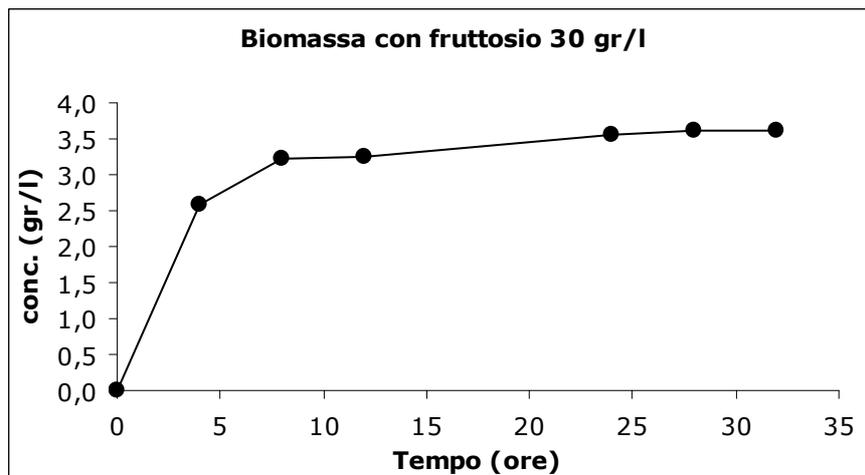


Grafico 26. Andamento della biomassa nella fermentazione con fruttosio (30 g/l)

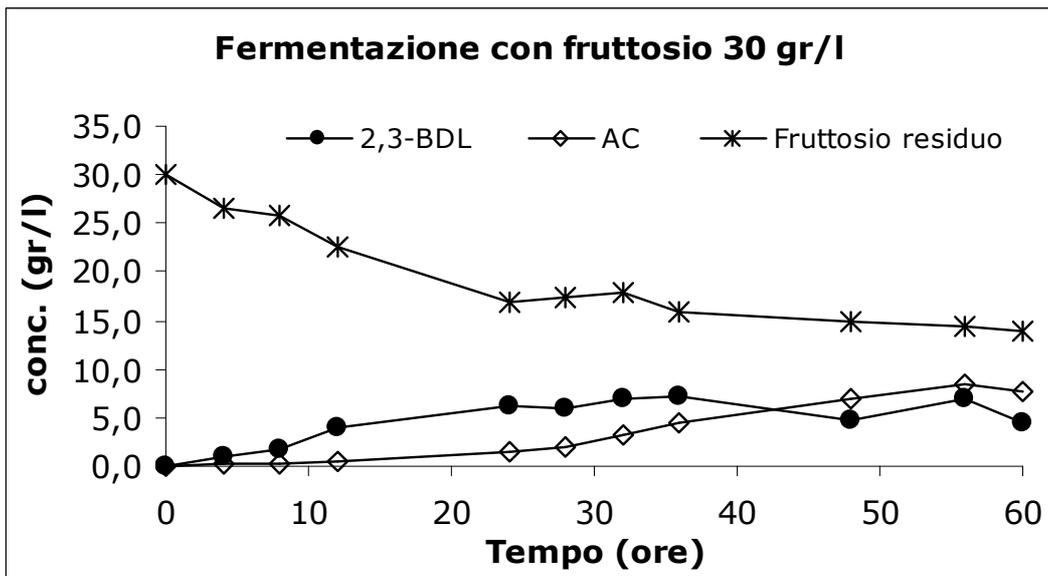


Grafico 27. Fermentazione con fruttosio (30 g/l)

3.3.14. Fermentazione con melasso di canna

La fermentazione è stata eseguita seguendo la metodologia prima descritta. Il melasso utilizzato nella prova aveva la seguente composizione: saccarosio (31.5), zuccheri invertiti (fruttosio e glucosio, 18.5%), acqua (20%) e il restante (30%) comprendeva la frazione azotata e i sali minerali. Il terreno è stato ottenuto diluendo il melasso (6 g) in acqua (100 ml) in modo da raggiungere una concentrazione totale di zuccheri pari a 30 g/l.

Ore di fermentazione	Biomassa (g/l)	2,3-BDL (gr/l)	Ac (gr/l)	Saccarosio residuo (gr/l)	Fruttosio e Glucosio residui (gr/l)
0	0,00	0,00	0,00	19,11	14,41
4	0,40	0,82	0,47	13,38	14,55
23	3,00	7,63	0,82	10,11	5,61
31	3,94	11,96	1,50	5,20	5,81
46	2,85	11,29	4,63	0,20	7,15
56	2,5	6,85	5,89	0,06	7,05

Tabella 13. Fermentazione con melasso di canna

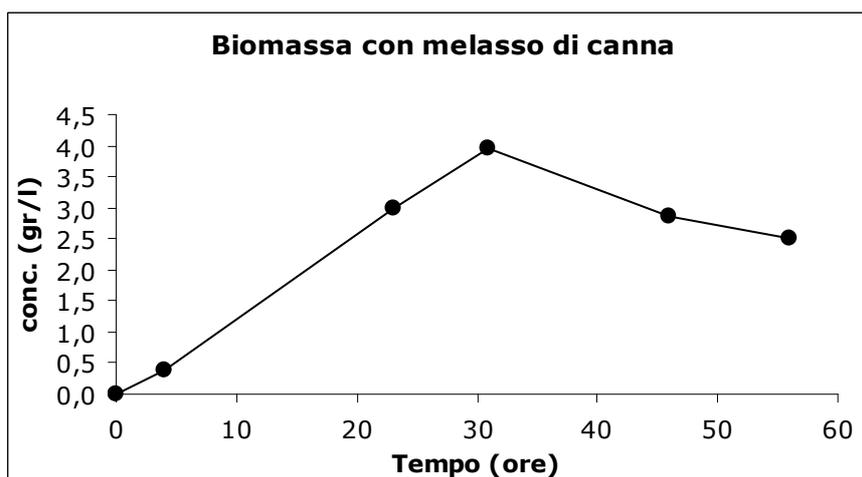


Grafico 28. Andamento della biomassa nella fermentazione con melasso di canna

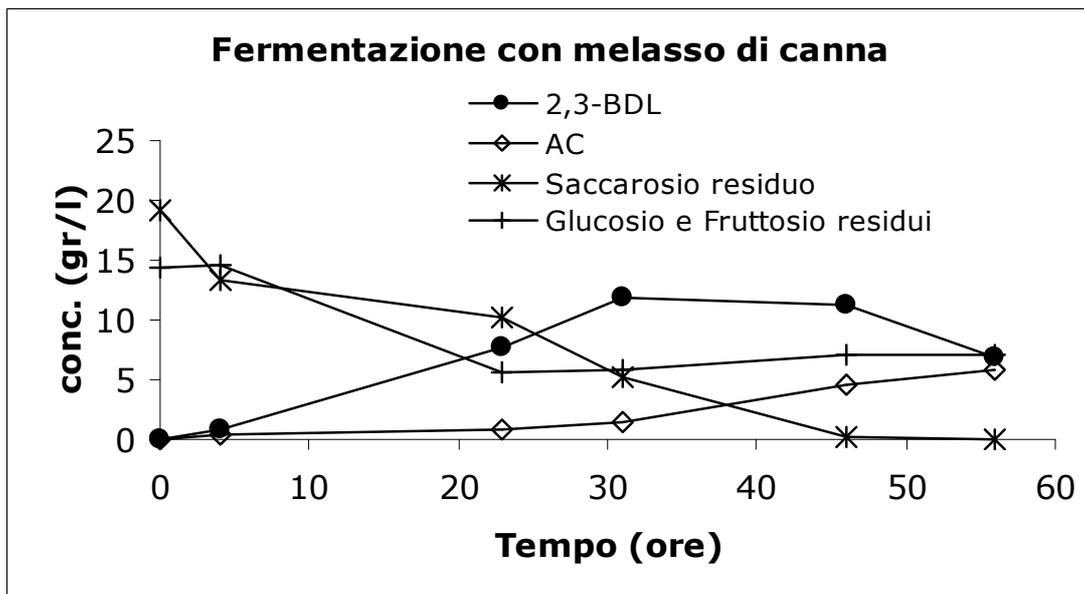


Grafico 29. Fermentazione con melasso di canna

3.4. Studio della via metabolica

3.4.1 Preparazione dell'estratto cellulare per lo studio delle deidrogenasi

Le cellule, il contenuto di una criovials, vengono coltivate in un terreno (100 ml in beuta da 250 ml) composto da saccarosio (40 g/l), bactopectone (20 g/l), estratto di lievito (10 g/l), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (6.8 g/l) e K_2SO_4 (2.6 g/l) a 39°C per 24 h in agitazione (110 r.p.m.). Una parte di questa coltura (20 ml) viene usata per inoculare un volume di terreno di ugual composizione (250 ml in beuta da 500 ml) e dopo una crescita di 48 h nelle medesime condizioni della precedente le cellule vengono separate per centrifugazione (10.000 r.p.m. per 10 min). Il precipitato viene sospeso in soluzione fisiologica (50 ml), la sospensione viene nuovamente centrifugata e le cellule così ottenute (0.8 g) vengono sospese in una soluzione tampone (tampone TEA, 10 ml) composta da trietanolamina (50 mM), EDTA (0.1 mM), β -mercaptoetanololo (1 mM) a pH 7.5. Alla sospensione così ottenuta vengono aggiunti lisozima (4.0 mg) e fenilmetilsulfonil fluoruro (1.0 mg), e questa viene lasciata in leggera agitazione a 30°C per 2.5 h quindi centrifugata (15.000 r.p.m. per 10 min) per allontanare i residui cellulari. Il supernatante rappresenta l'estratto cellulare grezzo contenente l'insieme degli enzimi citosolici del batterio.

3.4.2 Misura delle attività enzimatiche

Le attività diacetile-, acetoino- e acetilacetoino-reduttasiche sono state misurate aggiungendo un piccolo volume della soluzione enzimatica (alcuni μl) ad una miscela di reazione composta dal substrato (5 mM) e NADH (0.2 mM) in tampone fosfato 50 mM a pH 6.5. (1 ml) e seguendo per via spettrofotometrica la scomparsa del NADH attraverso la variazione di assorbanza a 340 nm e considerando un coefficiente di estinzione molare del cofattore ridotto pari a 6.22 UO/mmol.

Le attività 2,3-butandiolo- e acetoino-ossidasiche sono state misurate in maniera analoga a quanto sopra riportato utilizzando come miscela di reazione una soluzione di

2,3-butandiolo o acetoino (5 mM) e NAD⁺ (0.3 mM) in tampone fosfato 50 mM a pH 8.5 (1 ml).

Si definisce un'unità enzimatica (U) come la quantità di enzima che catalizza la trasformazione di una μ mole di substrato in un minuto.

3.4.3. Misura delle concentrazioni proteiche

La concentrazione proteica delle soluzioni enzimatiche è stata calcolata misurando l'assorbanza a 280 nm e considerando un coefficiente di estinzione pari a 1 UO/mg.

3.4.4. Conversione del piruvato in R-acetoino

Tale trasformazione è possibile grazie alla presenza degli enzimi α -acetolattato sintasi ed α -acetolattato decarbossilasi nell'estratto cellulare. L'estratto cellulare, ottenuto come descritto precedentemente, (4.0 ml) è stato aggiunto ad una soluzione di sodio piruvato (11 mM) in tampone fosfato 50 mM a pH 6 (100 ml). La reazione, mantenuta a temperatura ambiente per 3 h, viene saturata con NaCl (10 g) ed estratta con etile-acetato (2 x 30 ml). La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata dal sale ed analizzata per GLC su colonna chirale. L'analisi rivela la presenza di R-acetoino con eccesso enantiomerico > 95% (Figura 2).

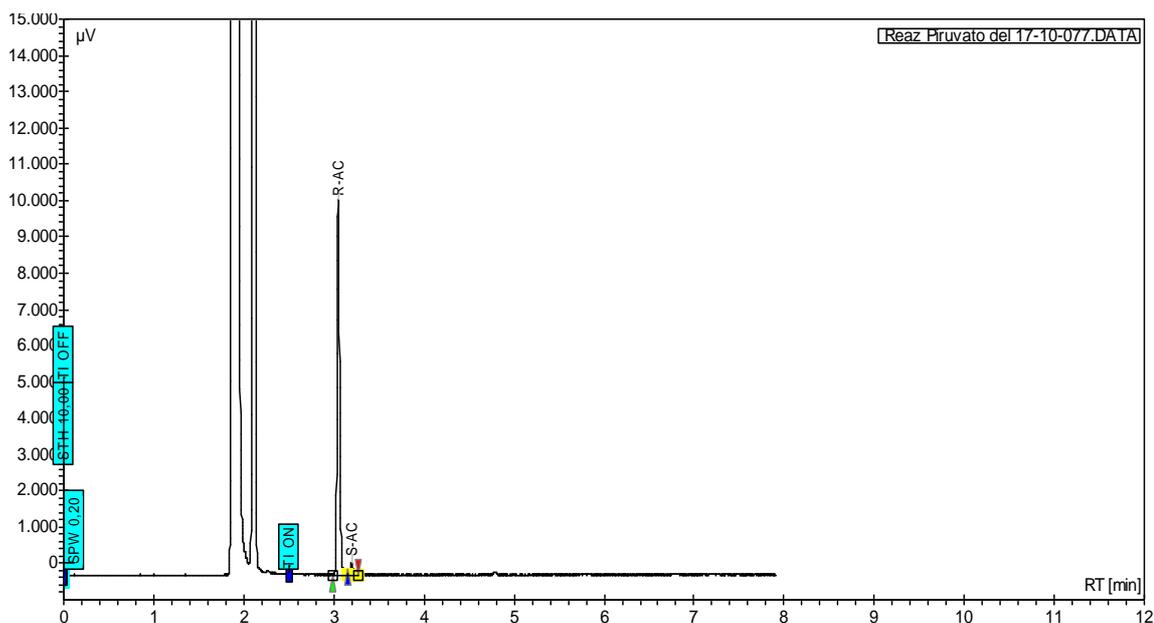


Figura 2. Gascromatogramma della reazione di sintesi di acetoino

La configurazione assoluta dell'acetoino prodotto è stata determinata indirettamente per riduzione chimica con NaBH_4 .

La fase organica è stata ridotta a piccolo volume per evaporazione a pressione ridotta (circa 2 ml) ed il residuo è stato diluito con una miscela metanolo/etere-etilico 1 : 4 (5 ml). La soluzione così ottenuta è stata raffreddata in bagno di ghiaccio e trattata con NaBH_4 (50 mg addizionati in tre porzioni ad intervalli di circa 3 minuti una dall'altra). La reazione è stata tenuta per 1 ora a temperatura ambiente quindi diluita con acqua (20 ml) ed estratta con etile acetato (2 x 10 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 anidro ed analizzata per gascromatografia su colonna chirale (Figura 3). L'analisi rivela la presenza di *2R,3R*-BD (r.t. 6.38 min, area 25.5%) e *meso*-BD (r.t. 6.76 min, area 64.3%).

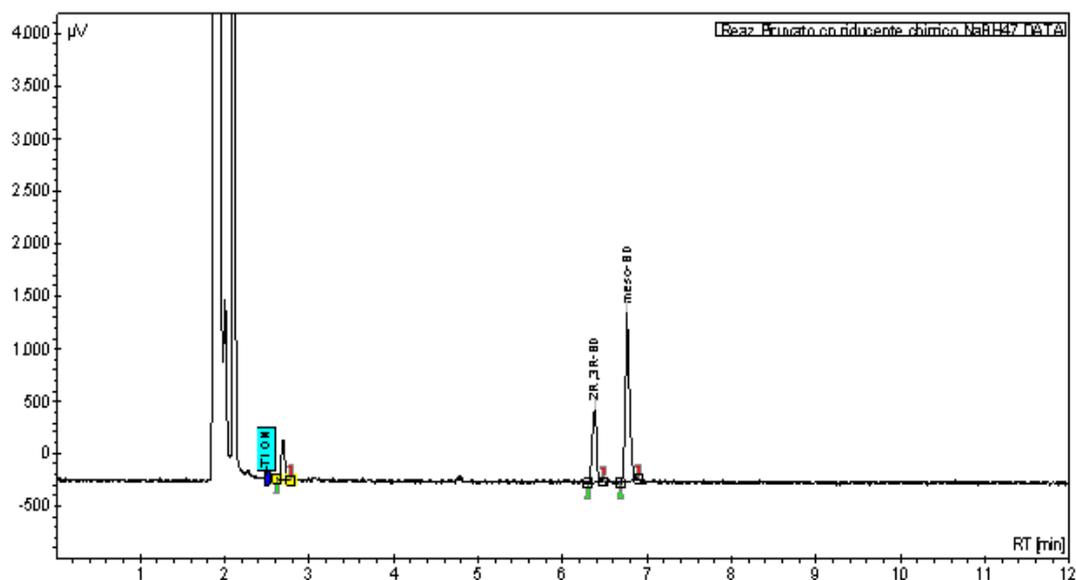


Figura 3. Gascromatogramma della riduzione chimica (NaBH_4) di AC ottenuto dal piruvato.

3.4.5. Biotrasformazione di diacetile (DAC) in acetilacetoino (AAC)

B. stearothermophilus è stato fatto crescere in un terreno di coltura denominato Bouillon (100 ml in beuta da 250 ml), costituito da estratto di carne (10 g/l), polipeptone (10 g/l) e NaCl (5 g/l). L'inoculo è stato eseguito con una cryovial e la coltura è stata incubata a 39°C per 48 h in agitatore oscillante (100 r.p.m.). La coltura (2 ml) viene utilizzata per inoculare un terreno Bouillon (100 ml in beuta da 250 ml) addizionato con una delle fonti di carbonio riportate in Tabella 4.

	Terreno	Fonte di carbonio aggiunta	Diacetile %
Beuta n° 1	Bouillon	Acetoino 0.5 %	1
Beuta n° 2	Bouillon	Glucosio 0.5 %	1
Beuta n° 3	Bouillon	Glucosio 0.5 %	--
Beuta n° 4	Bouillon	--	1

Tabella 4. Composizione dei terreni e concentrazione di DAC aggiunto

Le quattro colture sono state incubate per 24 h nelle stesse condizioni usate in precedenza. Dopo tale periodo, nelle beute n°1, 2 e 4, viene aggiunto diacetile (1.0 g) e l'incubazione viene continuata per ulteriori 24 h nelle stesse condizioni.

Le cellule vengono quindi allontanate mediante centrifugazione (6000 r.p.m, 10 min) e da di ogni coltura vengono prelevati campioni (2 ml) ed analizzati in gascromatografia su colonna chirale. Le analisi hanno mostrato la presenza di un prodotto incognito (a 4.28 min) in quantità rilevante nel campione prelevato dalla beuta n°1 (Figura 4), in misura minore in quello della coltura n°2 ed in tracce nel campione prelevato dalla n°4 .

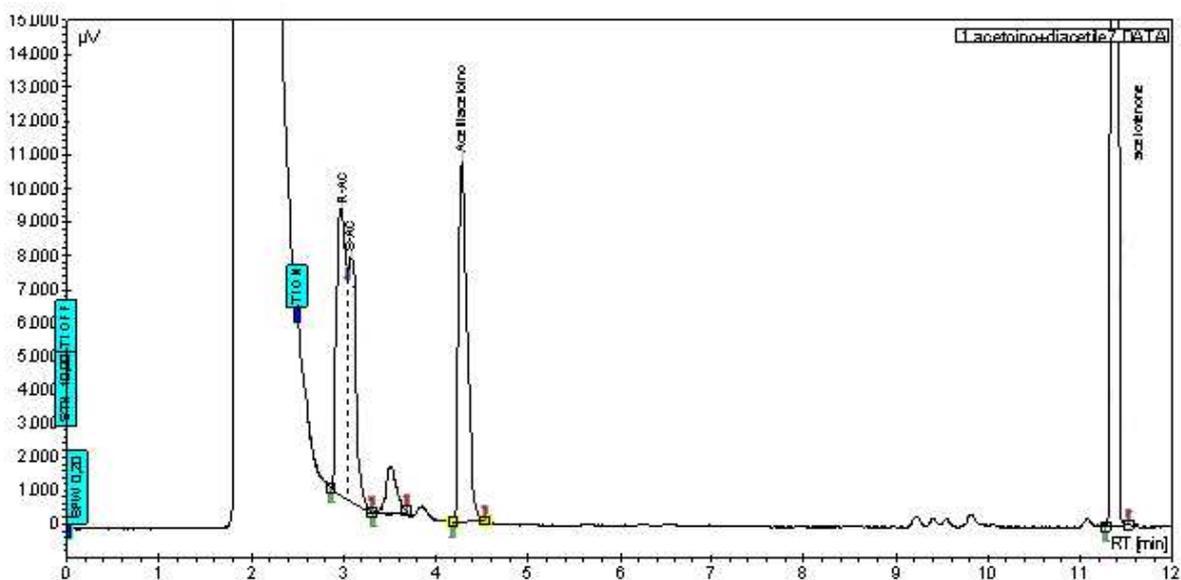


Figura 4. Gascromatogramma della biotrasformazione di DAC (beuta n°1)

Il prodotto incognito è stato purificato e caratterizzato. Il brodo della beuta n°1 è stato riscaldato a 80°C per 10 min e centrifugato (10.000 r.p.m., 20 min) per allontanare le proteine denaturate. Un successivo riscaldamento a 60°C per 2 h in un baeker aperto sotto cappa aspirante ha permesso l'allontanamento per evaporazione di gran parte del DAC. La soluzione acquosa è stata sottoposta a distillazione sottovuoto (rotavapor con bagno a 36°C e 10 mmHg). Il distillato ottenuto, scartando alcuni ml della testa e della coda è stato estratto con CH₂Cl₂ (3 x 60 ml), l'estratto organico è stato anidrificato con Na₂SO₄ anidro ed evaporato sottovuoto per allontanare gran parte del solvente (volume

residuo circa 1 ml). Il prodotto incognito è stato purificato per cromatografia flash su colonna di gel di silice ($d = 1 \text{ cm}$; $h = 15 \text{ cm}$), utilizzando come eluente cloroformio/cicloesano 8 : 2 (Figura 5).

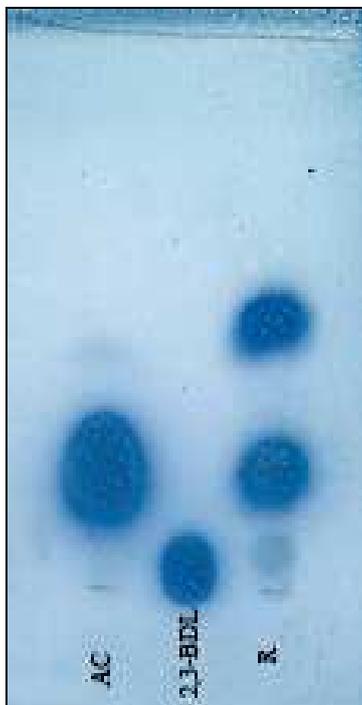


Figura 5. TLC dell'estratto della biotrasformazione (R) confrontata con standard AC e 2,3-BD

Si ottengono 200 mg di un prodotto che si presenta oleoso a T ambiente e con una struttura solida cristallina aghiforme a -20°C e che mostra all'analisi gascromatografica un picco a 4.30 min (Figura 6). Il suo spettro $^1\text{H-NMR}$ (vedi allegato: spettro 1) eseguito in CDCl_3 è il seguente e concorda con quello riportato in letteratura³⁹ per l'acetilacetoino: δ 1.60 (s, 3H, CH_3), 2.30 (s, 6H, 2 CH_3CO), 4.70 (s, 1H, OH).

L'AAC puro è stato usato per preparare soluzioni a titolo noto da utilizzare per la costruzione di una curva di calibrazione per l'analisi quantitativa utilizzando come standard interno l'acetofenone seguendo le indicazioni riportate nel paragrafo 3.2.3. E' stato così possibile quantificare una concentrazione di AAC pari a 0.8 g/L nella beuta n°1 che equivale ad una resa di biotrasformazione del 12 % (Figura 6).

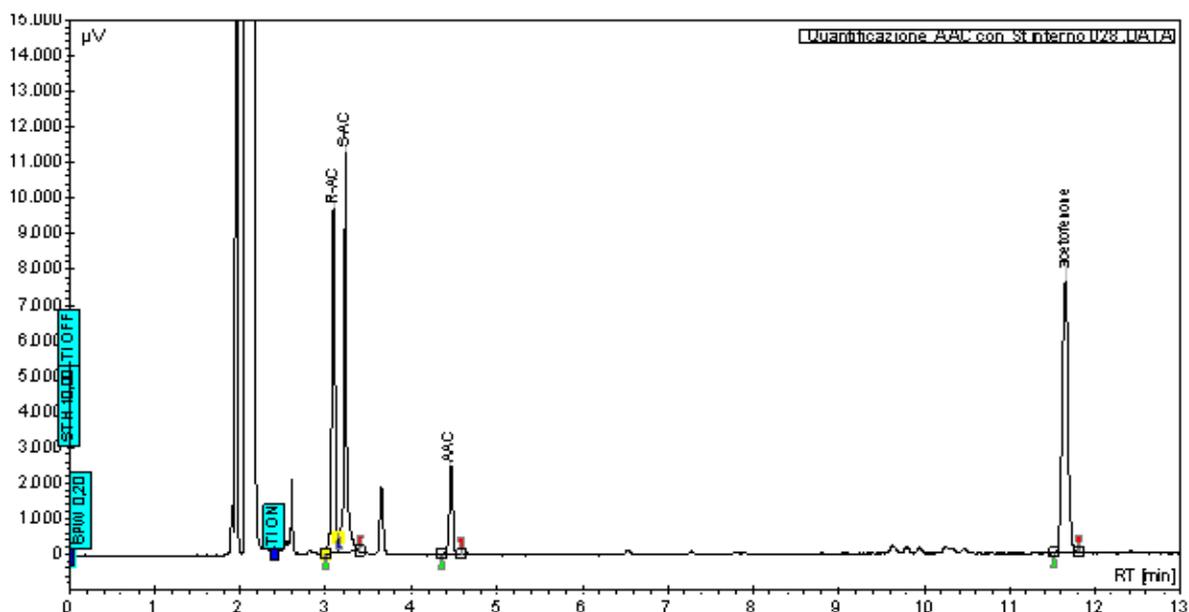


Figura 6. Gascromatogramma per la quantificazione dell'AAC

3.4.6. Separazione delle diacetile(acetoino) reduttasi A e B (DAC-reduttasi A e DAC-reduttasi B)

La separazione delle due deidrogenasi è stata ottenuta attraverso una cromatografia a scambio ionico su dietilaminoetil-Sepharose (DEAE-Sepharose), utilizzando per il dosaggio dell'attività enzimatica la riduzione dell'AC racemico secondo quanto descritto nel paragrafo 3.4.2. La colonna cromatografica (d = 1 cm; h = 4 cm) è stata attivata attraverso successivi lavaggi con NaOH 0.5M, H₂O distillata, HCl 0.5M e nuovamente H₂O per eliminare l'acidità, infine prima della cromatografia è stata equilibrata con il tampone TEA. L'estratto cellulare (10 ml) preparato secondo la procedura descritta nel paragrafo 3.4.1 è stato caricato impostando un flusso di 0.5 ml/min e dopo avere fatto scorrere tutto l'estratto cellulare la colonna è stata lavata con tampone TEA finché non era più rilevabile la presenza di proteine nell'eluato (vedi paragrafo 3.5.3). In questa fase sono state raccolte e conservate a 4°C frazioni di 0.5 ml. Le frazioni attive riunite (8 ml) contengono la DAC-reduttasi A parzialmente purificata.

La colonna di DEAE-Sepharose è stata eluita con una soluzione di NaCl 0.1M in tampone TEA e, quando non sono più presenti proteine nell'eluato, con una soluzione di NaCl 0.2M in tampone TEA. Tutte le frazioni sono state saggiate per l'attività enzimatica e quelle attive (8 ml) contengono la DAC-reduttasi B.

3.4.7. Riduzione enzimatica dell'AC racemico catalizzata da DAC-reduttasi B

Ad una miscela di reazione composta da tampone fosfato 50mM a pH 6.5 (10 ml) contenente EDTA (0,1 mM), β -mercaptoetanolo (1 mM), NAD^+ (0,3 mM), sodio formiato (100 mM) ed acetoino racemico (50 mM) è stata aggiunta l'enzima formiato deidrogenasi da *Candida bordini* (5 U). Quando l'assorbanza della soluzione, misurata a 340 nm, raggiunge un valore di 2 UO, si aggiunge DAC-reduttasi B (2 U). La reazione lasciata a 20°C per 12 h, viene saturata con NaCl ed estratta con CHCl_3 (3 x 10 ml). L'estratto organico, anidrificato con Na_2SO_4 è stato analizzato per gascromatografia con colonna chirale per verificare il grado di conversione e la stereochimica del 2,3-BD prodotto (Figura 7).

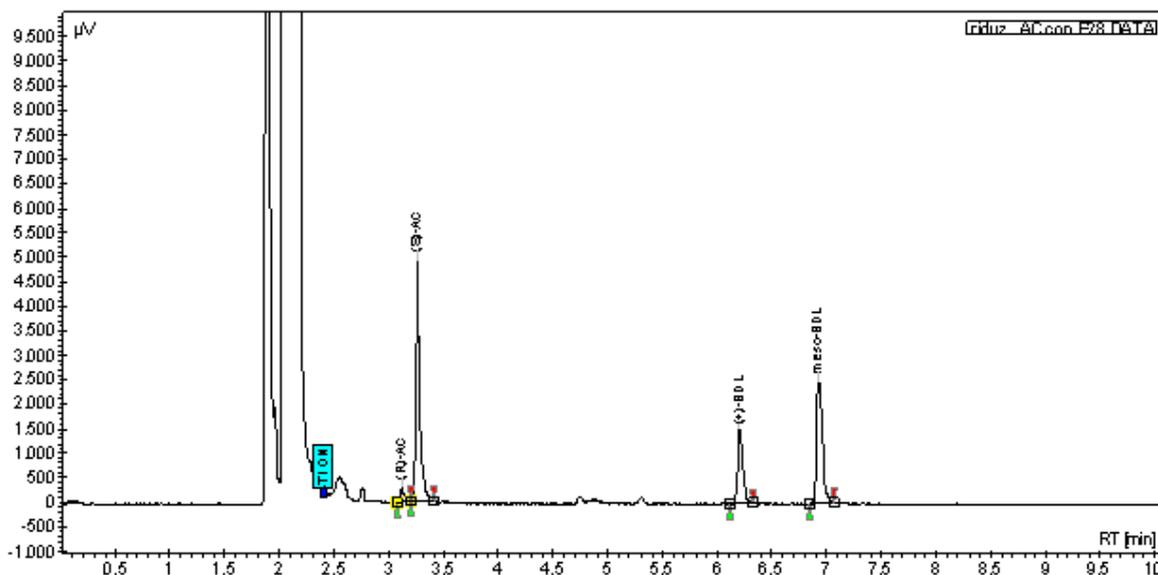


Figura 7. Gascromatogramma della reazione con DAC-reduttasi B

3.4.8. Riduzione di acetilacetoino catalizzata da DAC-reduttasi A

Ad una miscela di reazione composta da tampone fosfato 50 mM a pH 6.5 (10 ml) contenente EDTA (0,1 mM), β -mercaptoetanolo (1 mM), NAD^+ (0,3 mM), sodio formiato (100 mM) ed acetilacetoino (50 mM) è stata aggiunto l'enzima formiato deidrogenasi da *Candida bordini* (5 U). Quando l'assorbanza della soluzione, misurata a 340 nm, raggiunge un valore di 2 UO si aggiunge la DAC-reduttasi A (2.8). La reazione, lasciata a 20°C per 10 h, viene saturata con NaCl ed estratta con CHCl_3 (3 x 10 ml). L'estratto organico, anidrificato con Na_2SO_4 è stato analizzato per gascromatografia con colonna chirale per verificare il grado di conversione (Figura 8).

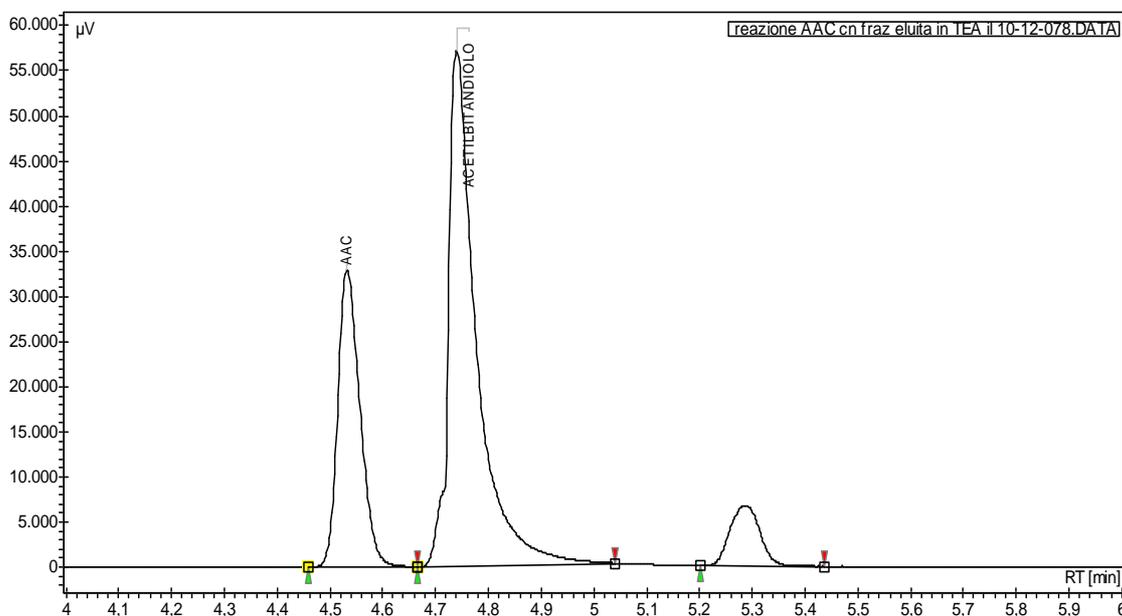


Figura 8. Gascromatogramma della reazione con DAC-reduttasi B

Dopo evaporazione sottovuoto del cloroformio, il residuo (60 mg) è stato analizzato tramite $^1\text{H-NMR}$ usando CDCl_3 come solvente (segnali dell'acetilbutandiolo): δ 4.05 (ddd, $J = 7,0$ Hz, H-4), 2.30 (s, 3H-1), 1.15 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H-5), 1,10 (s, 3H-6).

3.5 Applicazioni biocatalitiche

3.5.1. Preparazione dell'estratto cellulare

B. stearothermophilus (una cryovial) è stato inoculato in un terreno (250 ml in beuta da 500 ml) costituito da estratto di carne (10 g/l), polipeptone (10 g/l), NaCl (5 g/l) ed acetoino (5 g/l). Dopo 48 ore di incubazione a 39°C in agitatore oscillante (100 r.p.m.), le cellule sono state separate dal brodo per centrifugazione (10.000 r.p.m. per 10 min), sospese in soluzione fisiologica (50 ml) e nuovamente centrifugate. La biomassa così ottenuta (2 g) è stata sospesa in tampone fosfato 50 mM a pH 6.5 (50 ml) contenente β -mercaptoetanolo (1 mM) e trattata per estrusione ad alta pressione (1400 Kg/cm²) con l'ausilio di una French press. Il lisato cellulare è stato centrifugato (10.000 r.p.m. per 20 min) ed il supernatante è stato usato senza ulteriori purificazioni.

3.5.2. Sintesi di 2-idrossi-2-alchil-1,3-dichetoni catalizzata da Acetilacetoino-sintasi (AAC-S)

Il lisato cellulare ottenuto come precedentemente (50 ml) è stato diluito con tampone fosfato 50 mM a pH 6.5 (50 ml) ed alla soluzione sono stati aggiunti tiammina difosfato 0.4 mM, MgSO₄ 0.8 mM ed il corrispondente 1,2-dichetone 15 mM. La miscela di reazione è stata tenuta a 30°C in leggera agitazione (60 r.p.m.) e l'andamento della reazione è stato seguito per gascromatografia prelevando periodicamente dei campioni (1 ml). I campioni sono stati estratti con etile acetato (1 ml), la fase organica lavata con una soluzione satura di NaHCO₃, anidrificata con Na₂SO₄ anidro ed analizzata per GLC: carrier He (80 Kpascal). Quando la concentrazione del dichetone risulta trascurabile (< 5%), la miscela è stata scaldata a 100°C per 20 min in un recipiente sigillato e centrifugata (10.000 r.p.m. per 20 min) per eliminare le proteine. Il supernatante è stato estratto con etile acetato (2 x 30 ml), le fasi organiche riunite sono state lavate con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (30 ml), anidificate con Na₂SO₄ e portate a secco per evaporazione a pressione ridotta.

Nella reazione con **3,4-esandione**, la GLC con temperatura programmata 80-200°C (1.5°C/min) ha i seguenti tempi di ritenzione (min): 3,4-esandione, 5.2; 4-idrossi-4-etil-3,5-eptandione, 22.5.

Dopo cromatografia su gel di silice (eluente *n*-esano/etile acetato 20 :1) è stato ottenuto il **4-idrossi-4-etil-3,5-eptandione**: resa 82% riferita al prodotto grezzo, che mostra una purezza maggiore del 90% all'analisi ¹H-NMR: (CDCl₃) δ 4.7 (br s, 1H, OH), 2.62 (dq, 2H, J = 4.5, J = 45 Hz, CH₂), 2.62 (dq, 2H, J = 4.5, J = 26.0 Hz, CH₂), 2.02 (q, 2H, J = 4.0 Hz, CH₂), 1.0 (t, 6H, 2 CH₃), 0.8 (t, 3H, CH₃).

Nella reazione con **1-fenil-1,2-propanedione**, la GLC con temperatura programmata 100-200°C (5°C/min) ha i seguenti tempi di ritenzione (min): 1-fenil-1,2-propanedione, 10.9; 1-fenil-3-idrossi-3-metil-1,3-butandione, 17.3 e 17.6 in rapporto 3 : 7.

Dopo cromatografia su gel di silice (eluente *n*-esano/etile acetato 10 : 1), è stato ottenuto l'**1-fenil-3-idrossi-3-metil-1,3-butandione**: resa 45%, ee 40% ; [α]^D = +12,4 (c 0,5; CH₂Cl₂); ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.0-7.4 (m, 5H, Ph), 5.0 (br s, 1H, OH), 2.2 (s, 3H, CH₃-CO), 1.7 (s, 3H, CH₃).

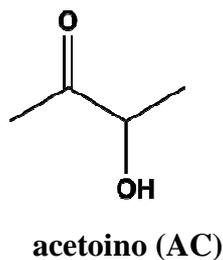
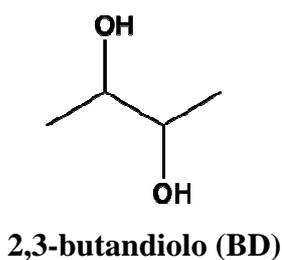
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il lavoro svolto durante il periodo di dottorato ha riguardato lo studio del batterio *Bacillus stearothermophilus* ATCC 2027 in ambito fermentativo non solo valutando le potenzialità di produzione di 2,3-butandiolo, un metabolita con larghe potenzialità di impiego, ma anche studiandone la via metabolica e gli enzimi in essa coinvolti.

Fermentazioni con Bacillus stearothermophilus

Nel laboratorio dove ho svolto la tesi di dottorato, *B. steraothermophilus* è stato impiegato con successo nel settore della biocatalisi nella risoluzione cinetica di alcoli chirali via ossidazione e nella riduzione di 1,2-dichetoni ad S,S-dioli.

Le analisi del brodo di coltura delle suddette biotrasformazioni hanno mostrato la presenza di 2,3-butandiolo (2,3-BD) ed acetoino (AC) in buone quantità dovute alla elevata presenza di saccarosio nel terreno di crescita.



Il 2,3-butandiolo trova numerosi impieghi in diversi settori, che vanno dall'industria alimentare a quella dei polimeri, oltre al suo utilizzo come biocarburante o additivo per i normali combustibili, fattore che ha reso ancora più importante la produzione di questo metabolita.

Le prime prove fermentative di *B. stearothermophilus* sono state fatte a 39°C utilizzando lo stesso terreno utilizzato per la crescita contenente saccarosio in concentrazione 40 g/l ed altri componenti quali bactopectone ed estratto di lievito rispettivamente in concentrazione 20 g/l e 10 g/l.

Tutte le fermentazioni sono state seguite per GLC utilizzando come standard interno una soluzione al 10% w/v di acetofenone in etile acetato.

Nel Grafico 1 sono riportati i dati relativi alla crescita cellulare mentre l'andamento della fermentazione relativo la produzione di butandiolo e acetoino è descritto nel Grafico 2.

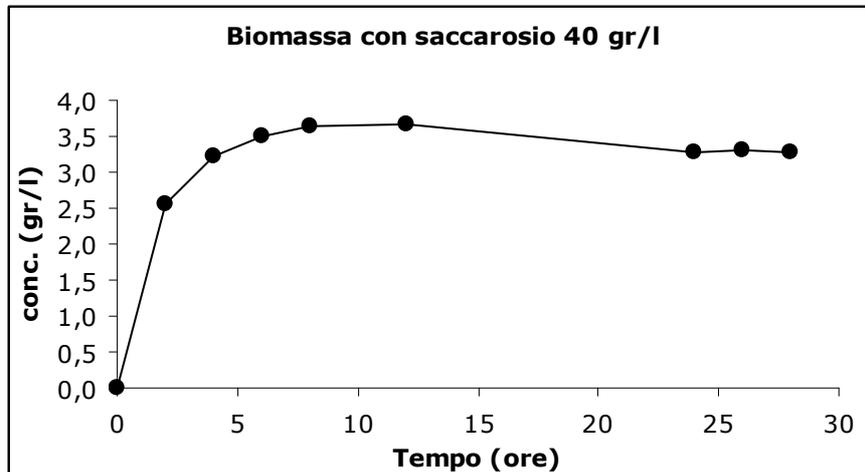


Grafico 1. Crescita con saccarosio (40 g/l)

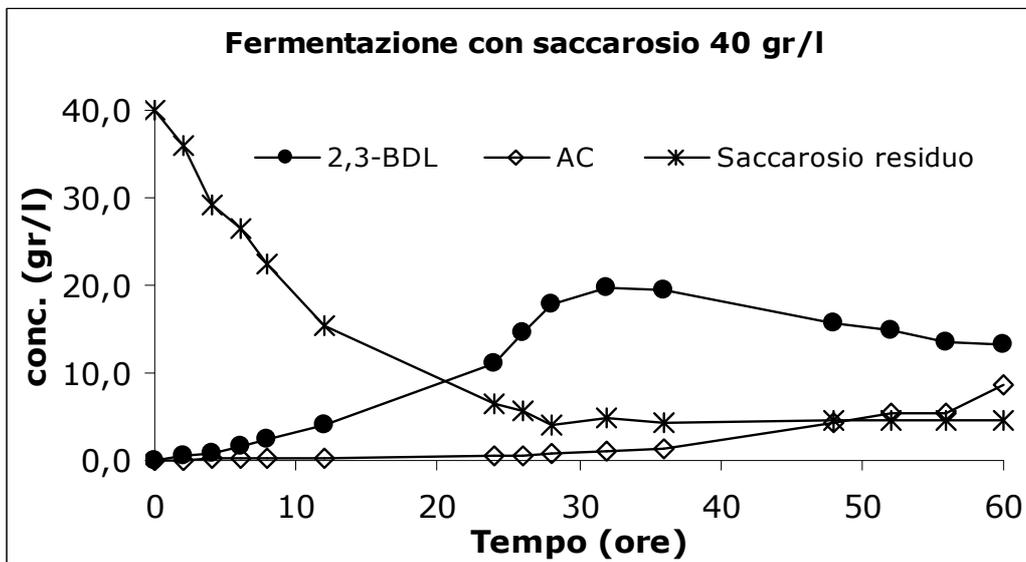


Grafico 2. Produzione di BD e AC con saccarosio 40 gr/l

La crescita cellulare presenta il suo massimo (3.6 gr/l) dopo 12 ore, mentre il picco di massima produzione di 2,3-BD (19.8 gr/l) viene raggiunto a 28 h di fermentazione. Il batterio durante questa prova non è in grado di consumare totalmente il saccarosio presente, lasciando a fine processo circa 4 gr/l di residuo. Si può anche notare come la

produzione di acetoino aumenti solo dopo 28 h, in concomitanza con una diminuzione di butandiolo. Si può ipotizzare che l'aumento della concentrazione di acetoino sia legata all'ossidazione del butandiolo prodotto precedentemente infatti la somma dei due metaboliti rimane costante nel tempo. Di conseguenza si può ipotizzare che *B. stearothermophilus* sia in grado di utilizzare butandiolo per generare potere riducente (NADH). Sulla base di questo primo risultato sono state condotte fermentazioni variando la concentrazione di saccarosio.

Dal momento che il saccarosio non viene consumato completamente anche a tempi piuttosto lunghi di fermentazione, la sua concentrazione è stata diminuita a 30 g/l.

Nel Grafico 3 sono riassunti i dati di questa fermentazione.

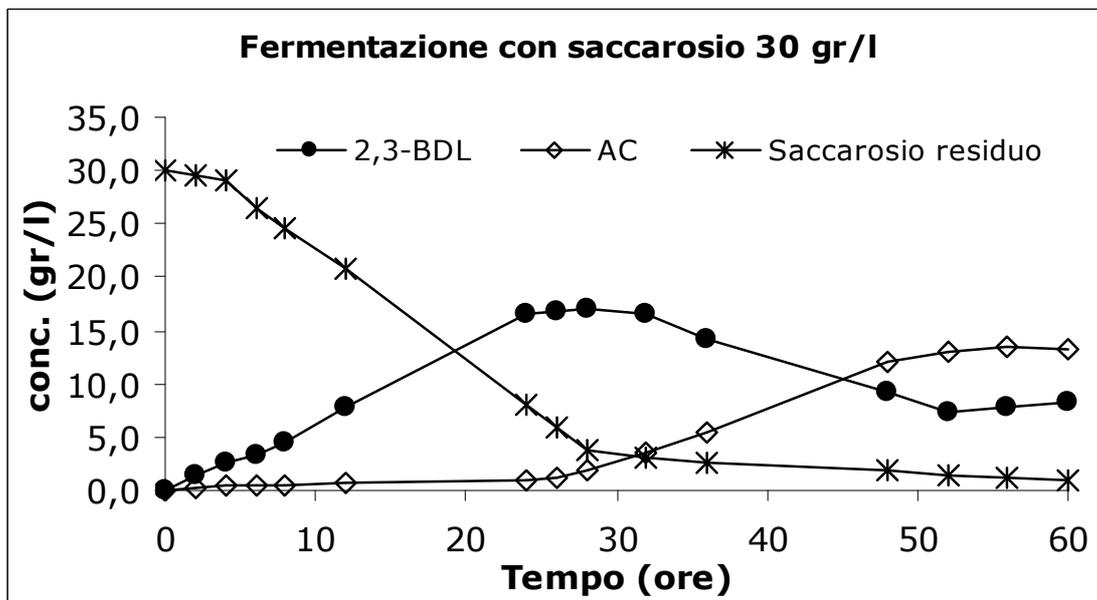


Grafico 3. Produzione di BD ed AC con saccarosio (30 g/l)

In questa fermentazione il saccarosio residuo si è ridotto ad 1 gr/l mantenendo costante la quantità di cellule (3.5 gr/l in 12 h), mentre la produzione di butandiolo raggiunge il suo massimo (17 gr/l) dopo 28 h come nella prova precedente con una resa di conversione del saccarosio in 2,3-BD è prossima al 100%. Anche in questo caso a tempi lunghi si ha un forte aumento nella quantità di acetoino con la conseguente diminuzione del butandiolo.

Allo scopo di verificare il legame esistente fra i componenti del brodo di coltura, la crescita batterica e la produzione di metaboliti si sono utilizzate concentrazioni di

saccarosio via via decrescenti (i.e. 20 g/l, 10 g/l e 0 g/l) confrontandole con le prove a 30 e a 40 g/l.

Nel grafico 4 sono riportate le concentrazioni di biomassa ottenute alle varie concentrazioni di saccarosio e anche in assenza della fonte di carbonio principale.

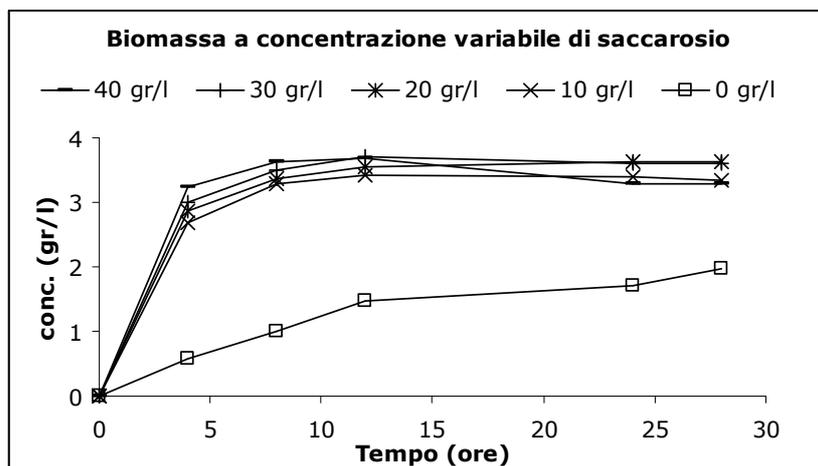
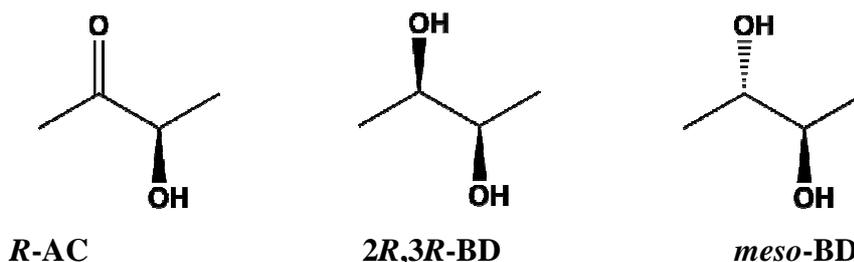


Grafico 4. Crescita di *B. stearotherophilus* a diverse concentrazioni di saccarosio

Si può notare che all'aumentare della concentrazione di saccarosio si ha un aumento nella velocità di raggiungimento della fase di crescita stazionaria e la quantità di biomassa si attesta a circa 3.6 gr/l per tutte le prove in cui è presente saccarosio anche se a concentrazioni diverse. Il fatto che si abbia comunque una crescita cellulare nella prova svolta in assenza di saccarosio (circa 2 g/l di cellule dopo 28 h) dimostra che la crescita del batterio è comunque legata anche agli altri componenti presenti del terreno. Tutte le fermentazioni sono state analizzate per via gascromatografica su colonna chirale. Si ottengono in questo modo dati quantitativi di produzione dei vari metaboliti oltre alla loro stereochimica. In tutti i casi si ottengono miscele di *R*-acetoino (*R*-AC), 2*R*,3*R*-butandiolo (2*R*,3*R*-BD) e *meso*-butandiolo (*meso*-BD).



Nella Tabella 1 sono riportata i valori massimi di produzione di butandiolo (8-28h) ed acetoino (36-60 h) ottenuti nelle fermentazioni a diversa concentrazione di saccarosio, gli zuccheri residui e la stereoselettività del processo.

Tabella 1. Produzione di BD e AC per fermentazione di *B. stearrowthermophilus* con diverse concentrazioni di saccarosio

Saccarosio (gr/l)	Tempo (ore)	Zuccheri residui (gr/l)	R-AC gr/l (ee%)	2R,3R-BD gr/l (ee%)	meso-BD gr/l
40	32	4.8	2.2 (94)	6.8 (95)	13
	60	4.5	8.7 (91)	4.8 (95)	8.4
30	28	3.7	1.9 (92)	6.9 (97)	9.8
	60	1	13.2 (88)	2.9 (91)	5.5
20	24	1.2	2.5 (92)	3.5 (95)	6.5
	48	0	11.6 (90)	1.4 (90)	2.3
10	8	6.1	0.5 (94)	1.9 (94)	3.5
	36	0	8.9 (92)	0.3 (89)	0.4
0	12	0	1.1 (95)	0.1 (87)	0.1

La variazione della concentrazione di saccarosio, pur non influenzando la crescita cellulare, ha un ruolo fondamentale nella produzione dei metaboliti. Il diminuire del disaccaride porta ad una diminuzione netta della produzione dei prodotti di fermentazione, fino ad arrivare ad un totale di 0.2 gr/l di 2,3-BD ed 1.1 g/l di acetoino in assenza di saccarosio.

L'ipotesi dell'esistenza di un equilibrio reversibile fra acetoino e butandiolo trova ulteriore sostegno dall'analisi dei risultati ottenuti dalla fermentazione condotta in assenza di saccarosio: in questo caso la produzione di acetoino è nettamente superiore a quella di butandiolo non essendo disponibile un surplus di NADH.

Un'ulteriore considerazione riguarda la stereochimica dei prodotti formati durante il processo fermentativo. L'analisi gas-cromatografica dei prodotti effettuata con colonna chirale mostra che i due prodotti chirali (*R*-AC, *2R,3R*-BD) si formano con elevati eccessi enantiomerici. Se si considera invece il rapporto fra i due diastereoisomeri *meso*-BD e *2R,3R*-BD si nota sempre una prevalenza del primo sul secondo, con un rapporto

di circa 1.9 : 1 nella prima fase in cui si ha il valore massimo di produzione di questo metabolita. Questo rapporto non varia anche a tempi lunghi quando BD si trasforma in AC quando la concentrazione di saccarosio è 30 o 40 g/l, mentre cala abbastanza vistosamente a più basse concentrazioni di saccarosio (20 o 10 g/l).

Altri disaccaridi, come maltosio, cellobiosio e lattosio, sono stati utilizzati nella fermentazione con *Bacillus stearothermophilus*. La scelta di questi substrati è stata effettuata prendendo in considerazione quelli maggiormente presenti in matrici complesse di origine agroindustriale. Il maltosio ed il cellobiosio sono i disaccaridi derivanti dalla parziale idrolisi rispettivamente dell'amido e della cellulosa mentre il lattosio è presente negli scarti dell'industria casearia. La concentrazione di 30 g/l, che negli esperimenti con saccarosio è risultata essere quella in grado di garantire il miglior consumo di zucchero e la migliore produzione di metaboliti e biomassa, è stata utilizzata anche per studiare il potenziale fermentativo degli altri disaccaridi.

Nel grafico 5 sono riportati i dati della crescita cellulare di *B. stearothermophilus* con i vari disaccaridi e i dati sono messi a confronto con quelli ottenuti con saccarosio.

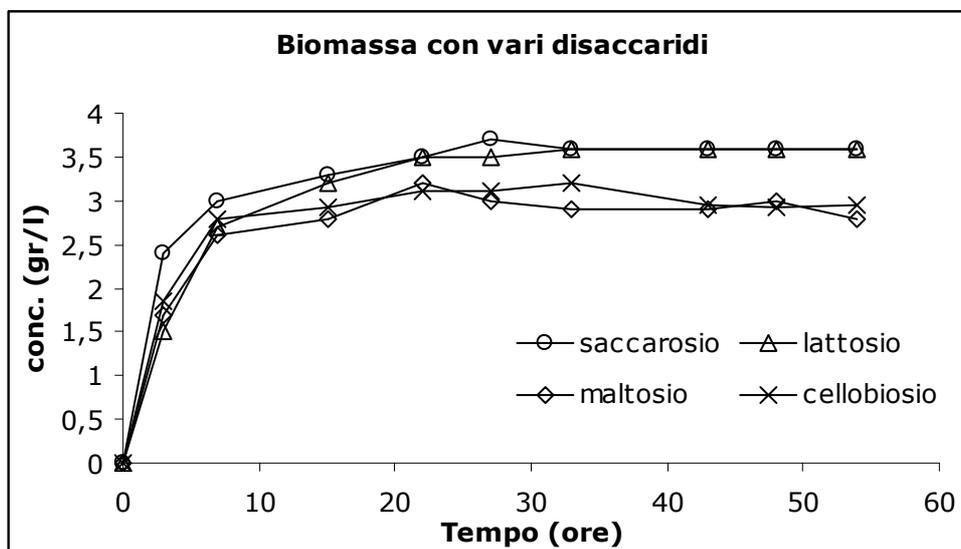


Grafico 5. Crescita di *B. stearothermophilus* con vari disaccaridi (30 g/l)

Il lattosio fornisce una quantità di biomassa paragonabile al saccarosio anche se a tempi più lunghi, mentre con il maltosio ed il cellobiosio si ottiene una quantità di cellule inferiori rispettivamente del 12 e del 20%.

Questi risultati sono un'ulteriore conferma del fatto che la fonte di carbonio gioca un ruolo molto importante nella produzione di metaboliti, mentre influenza poco l'andamento della biomassa.

L'analisi dei prodotti di fermentazione e del consumo degli zuccheri ha dimostrato che il *Bacillus stearothermophilus* non è in grado di utilizzare disaccaridi diversi dal saccarosio per produrre butandiolo e acetoino (Tabella 2) e di conseguenza lo scarso consumo degli zuccheri durante la fermentazione si ripercuote direttamente sulla produzione dei due metaboliti.

Tabella 2. Produzione di BD e AC per fermentazione di *B. stearothermophilus* con disaccaridi (30 gr/l) e saccarosio a confronto.

Disaccaridi (30 gr/l)	Tempo (ore)	Zuccheri residui (gr/l)	AC gr/l	BD gr/l
Saccarosio	28	3.7	1.9	17
Lattosio	48	23.2	0.7	0.3
Maltosio	23	28.6	1.1	0.9
Cellobiosio	55	25	2.7	0.9

Lo studio riguardante le capacità fermentative di *B. stearothermophilus* è proseguito testando vari monosaccaridi. Sono stati presi in esame i monomeri presenti nei disaccaridi utilizzati in precedenza, ovvero glucosio, fruttosio e galattosio, ed è stato testato anche lo xilosio per via dell'elevata concentrazione di questo zucchero nell'emicellulosa, matrice molto studiata come sottoprodotto utilizzabile per le fermentazioni.

La crescita cellulare con fruttosio e glucosio (3.5 g/l) risulta comparabile con quella ottenuta con saccarosio mentre galattosio e xilosio danno rispettivamente 3 e 2.4 g/l dopo 12 h.

Anche in questo caso i risultati ottenuti nella produzione di 2,3-butandiolo e acetoino non sono paragonabili a quelli della fermentazione con saccarosio 30 gr/l. Per il glucosio e il fruttosio il consumo della fonte carboniosa durante il processo è stato solamente parziale, mentre con il galattosio e lo xilosio vengono consumati solo pochi gr/l di zucchero durante il processo

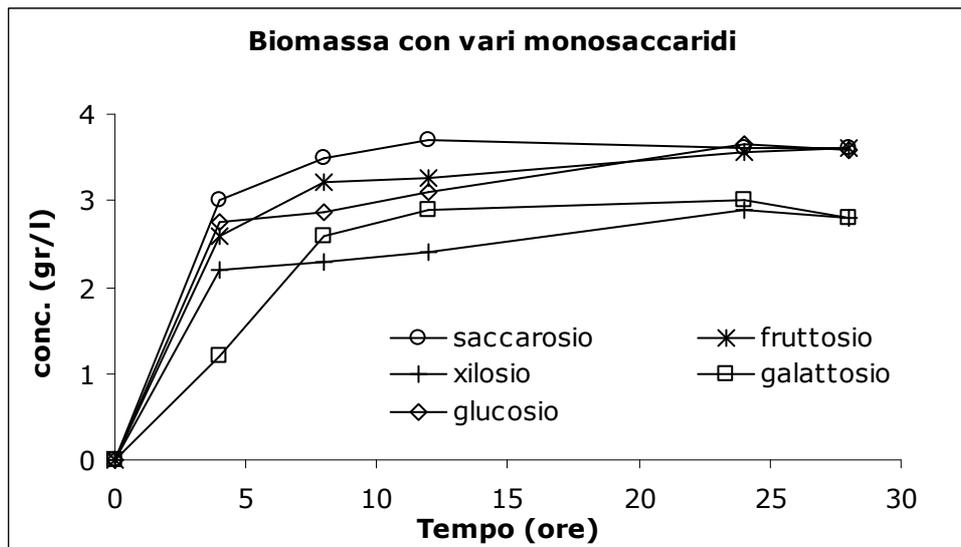


Grafico 6. Crescita di *B. stearothermophilus* con vari monosaccaridi (30 g/l)

. La Tabella 3 riporta i dati relativi al picco di massima produzione dei due metaboliti, le quantità di monosaccaridi consumate e la purezza ottica dei prodotti ottenuti.

Tabella 3. Produzione di BD e AC per fermentazione di *B. stearothermophilus* con monosaccaridi (30 gr/l) e saccarosio a confronto

Zuccheri (30 gr/l)	Tempo (ore)	Zuccheri residui (gr/l)	R-AC gr/l (ee%)	2R,3R-BD gr/l (ee%)	meso-BD gr/l
Saccarosio	28	3.7	1.9 (92)	6.9 (97)	9.8
	60	1	13.2 (88)	2.9 (91)	5.5
Glucosio	32	16	2.6 (92)	3.1 (95)	5.6
	60	14.3	7.5 (92)	2.2 (94)	2.7
Fruttosio	36	15.8	4.5 (94)	2.1 (96)	5
	60	14.0	7.8 (94)	2.0 (94)	2.5
Galattosio	24	28.6	3.0 (92)	0.9 (95)	2.5
	60	25.8	6.7 (93)	0.4 (95)	2.8
Xilosio	24	27.4	4.2 (95)	0.3 (80)	1.3
	60	26.2	5.5 (95)	0.15 (70)	0.45

Per quanto riguarda il glucosio ed il fruttosio, le rese dei due metaboliti sono paragonabili a quelle del saccarosio solo se si tiene conto che circa il 50% dello zucchero non viene utilizzato, mentre galattosio e l' xilosio, inoltre, non vengono praticamente metabolizzati da *B. stearothermophilus*. I dati di fermentazione, infatti, sono paragonabili a quelli ottenuti senza fonte di carbonio: basse rese dei due metaboliti e maggiori quantità di acetoino rispetto al butandiolo.

In tutti i casi, comunque, la purezza ottica dei prodotti ottenuti è molto elevata mentre varia, a seconda del tipo di zucchero, il rapporto fra i due diastereoisomeri del butandiolo. Infatti nel caso del fruttosio e del glucosio il rapporto fra *meso*-BD ed *2R,3R*-BD è paragonabile a quello riscontrato con l' utilizzo di saccarosio (circa 1.9 : 1), mentre nel caso dello xilosio e del galattosio c'è un aumento della forma *meso* (2.4 : 1) e l' *R*-acetoino è il prodotto principale della fermentazione indipendentemente dal tempo.

I risultati fin qui ottenuti che mostrano una buona capacità di *B. stearothermophilus* di utilizzare il saccarosio e i suoi monomeri, ci hanno suggerito di sfruttare il melasso di canna come fonte di carbonio per la fermentazione. Il melasso, da noi utilizzato, è un sottoprodotto industriale che contiene per il 40 % acqua e per il 60% una miscela di saccarosio e dei relativi zuccheri invertiti insieme ad una piccola quantità di sali. La fermentazione di melasso con *Bacillus stearothermophilus* è stata fatta nelle medesime condizioni utilizzate per gli altri carboidrati avendo come terreno di coltura unicamente il melasso diluito in modo tale da portare la concentrazione totale degli zuccheri a 30 g/l.

Nel Grafico 7 viene mostrato l' andamento della fermentazione utilizzando melasso di canna.

B. stearothermophilus è in grado di utilizzare questo terreno per produrre butandiolo ed acetoino, ottenendo una produzione massima di 12 gr/l di BD in 32 ore e di 5.9 g/l di AC a fine processo (56 ore).

E' importante anche notare che fra gli zuccheri presenti nel terreno il saccarosio è quello che viene metabolizzato più velocemente, arrivando ad una totale scomparsa già dopo 46 ore.

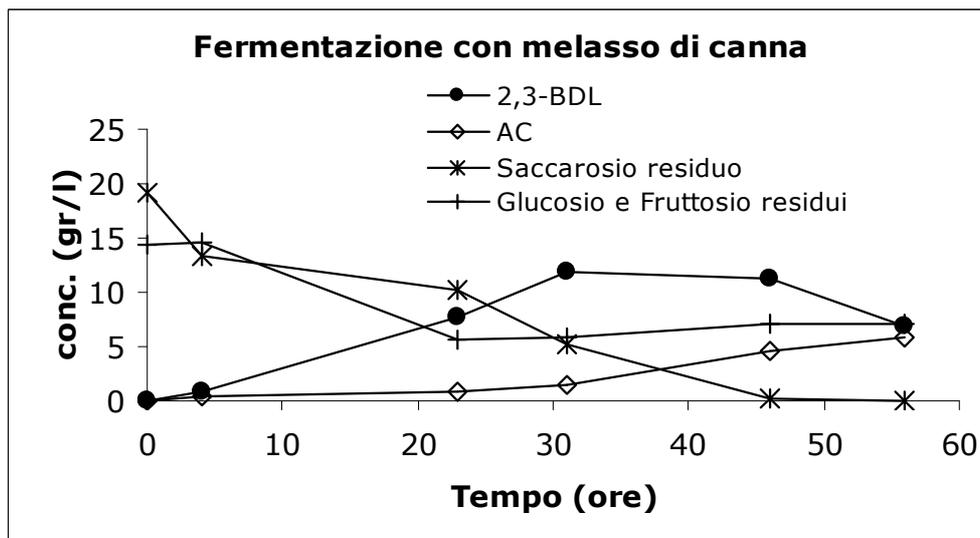


Grafico 7. Produzione di BD ed AC melasso di canna

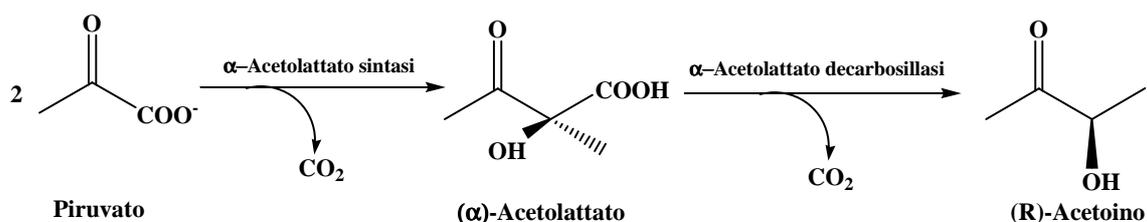
Il fruttosio ed il glucosio invece vengono consumati solo parzialmente, e questo rispecchia l'andamento già riscontrato in precedenza nelle prove effettuate con i singoli monosaccaridi.

Studio della via metabolica

Un aspetto importante delle fermentazioni è la comprensione dei meccanismi biochimici che permettono al microrganismo di produrre il metabolita in questione. I dati che emergono da queste indagini potranno orientare interventi sulla modifica dei parametri di fermentazione nonché suggerire successivi sviluppi verso l'ingegnerizzazione genetica del batterio.

La comprensione della via metabolica sfruttata da *B. stearothersophilus* per la produzione di 2,3-butandiolo rappresenta la parte centrale della mia ricerca durante il periodo di dottorato. Questi studi si sono basati su risultati riportati in letteratura riguardanti la produzione batterica di 2,3-BD. È noto che l'acetoino derivato del piruvato rappresenta il precursore del 2,3-BD. La conoscenza della sua configurazione assoluta è fondamentale per comprendere i meccanismi che portano alle due forme stereoisomeriche di 2,3-BD prodotte da *B. stearothersophilus*. La prima fase della

ricerca si è proposta di verificare che anche *B. stearothermophilus* formesse R-AC dal piruvato come la maggior parte dei batteri produttori di 2,3-BD. Per fare ciò è stata riproposta una strategia già utilizzata da Berl nel 1951,²⁵ basata sull'utilizzo dei due enzimi α -acetolattato sintasi e α -acetolattato decarbossilasi presenti nell'estratto cellulare grezzo (Schema 1).



Schema 1. Biosintesi dell'acetoino partendo da piruvato

Addizionando piruvato all'estratto cellulare posto in tampone fosfato a pH 6.5 e lasciando la miscela a temperatura ambiente per alcune ore, si osserva la formazione di acetoino. L'analisi gascromatografica della miscela di reazione, effettuata con colonna chirale capace di separare i vari enantiomeri, ha mostrato la netta prevalenza dell'enantiomero con tempo di ritenzione minore (r.t. 3.05 min; ee. >95%) (Figura 1).

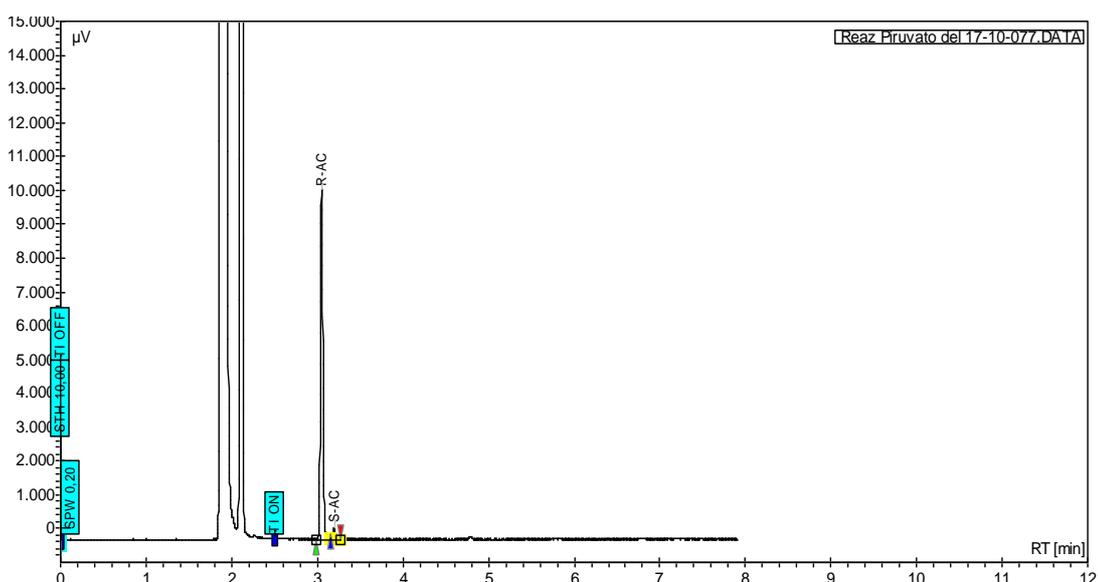
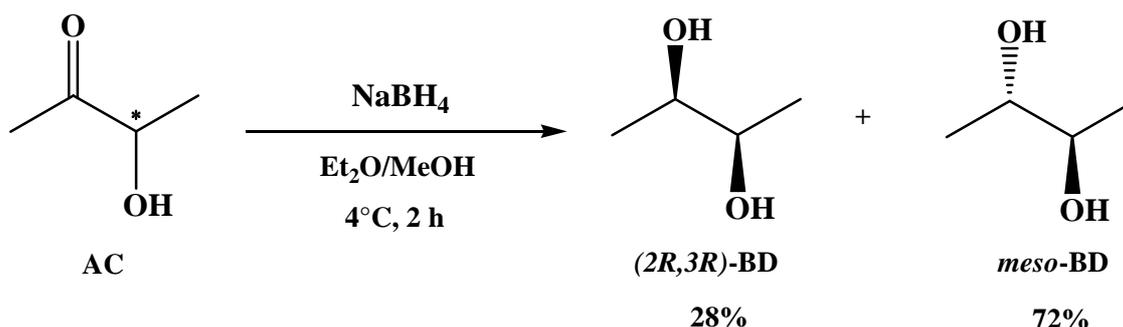


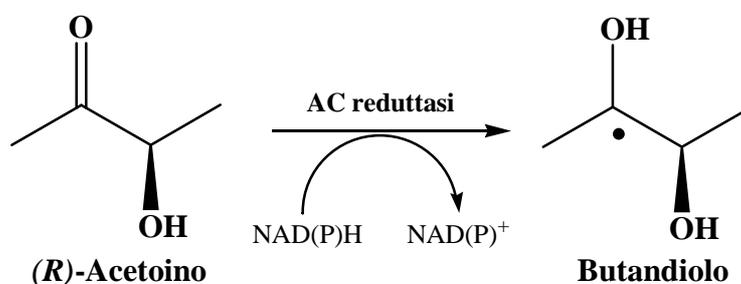
Figura 1. Gascromatogramma della biotrasformazione di piruvato in acetoino

L'estrazione e la purificazione cromatografica dell'AC risultano problematiche a causa della sua igroscopicità e della tendenza a dimerizzare. Non esistono inoltre in commercio standard otticamente puri di questo composto, di conseguenza per l'assegnazione della configurazione assoluta il prodotto ottenuto è stato ridotto con NaBH_4 (Schema 2) ottenendo una miscela di *meso*-BD e *2R,3R*-BD in rapporto 2.5 : 1.



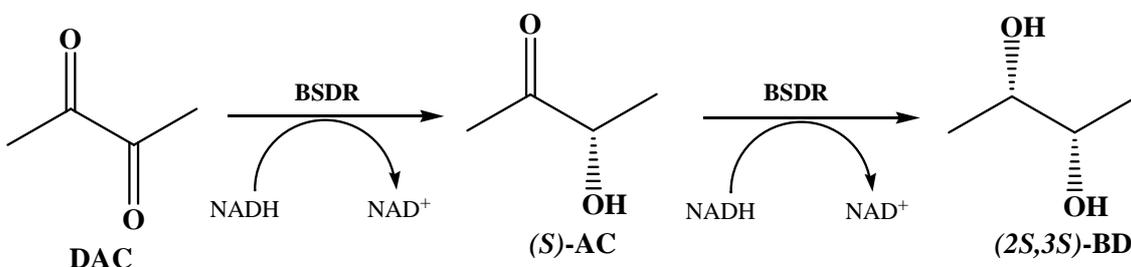
Schema 2. Riduzione chimica dell'acetoacido ottenuto dalla biosintesi del piruvato

Entrambi i prodotti contengono uno stereocentro con configurazione R che deriva dall'unico centro chirale presente nell'acetoacido di partenza. Si può escludere che durante la riduzione ci sia racemizzazione dell'AC altrimenti assisteremmo anche alla comparsa di *2S,3S*-BD, di conseguenza si può dedurre che l'AC ottenuto per conversione del piruvato ad opera dell' α -acetolattato sintasi e dell' α -acetolattato decarbossilasi ha configurazione R come avviene per maggior parte dei batteri produttori di 2,3-BD. In questi batteri (*Bacillus polymixa*⁷ e *Klebsiella pneumoniae*¹⁰) la via catabolica prevede la riduzione dell'AC catalizzata da AC-reduttasi NADH o NADPH dipendenti (Schema 3).



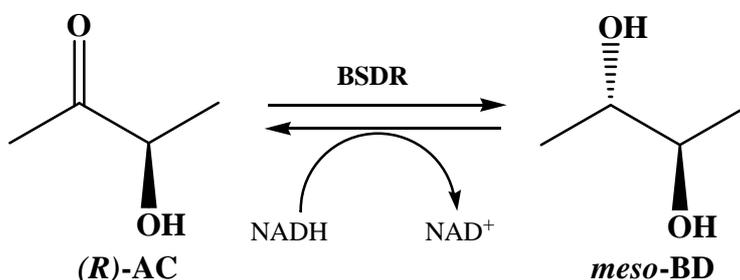
Schema 3. Formazione di butandiolo secondo la via catabolica

Un lavoro pubblicato³⁴ dal gruppo di ricerca nel quale ho svolto il dottorato ha dimostrato che *B. stearotermophilus* possiede una Diacetile (Acetoino) Reduttasi (BSDR) in grado di catalizzare le reazioni di riduzione reversibile del diacetile a 2S,3S-butandiolo da parte del NADH (Schema 4).



Schema 4. Riduzione di diacetile con BSDR.

Questo enzima accetta come substrato anche l'*R*-AC la cui riduzione porta alla formazione di *meso*-BD (Schema 5).



Schema 5. Produzione di *meso*-BD da *R*-AC

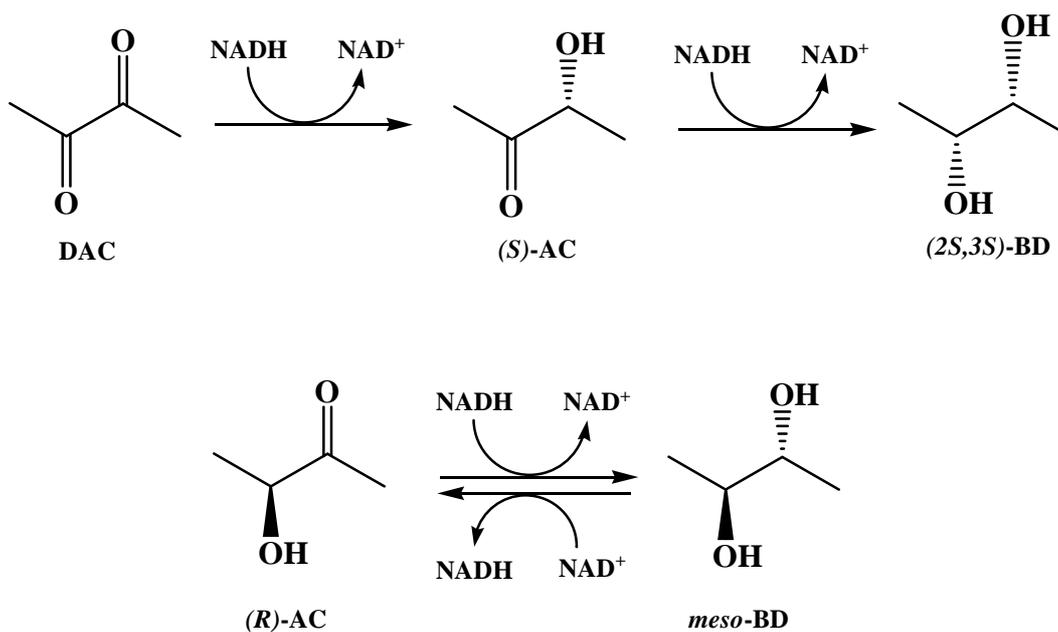
Osservando però i dati di purificazione della BSDR (Tabella 4) si può notare che circa il 50 % delle U (misurate nella riduzione dell'AC racemico) presenti nell'estratto cellulare non venivano recuperate durante il primo passaggio cromatografico su DEAE-sepharose.

E' stata verificata la presenza di una seconda deidrogenasi NAD-dipendente eluibile da DEAE Sepharose con NaCl 0.2M e anch'essa in grado di catalizzare la riduzione dell'AC racemico da parte del NADH.

Tabella 4. Purificazione dell'enzima BSDR

	Volume (mL)	Attività Tot. (U)	Proteine Tot. (mg)	Attività Specifica (U/mg)	Resa (%)	Purificazione (volte)
Estratto grezzo	75	977	860	1.14	100	1
DEAE Sephar.	79	458	136	3.37	47	2.9
Cibacron blue	2.5	450	6.3	71.4	46	62.6

Tale enzima parzialmente purificato è stato utilizzato per catalizzare alcune reazioni al fine di comprenderne la specificità (Schema 6).

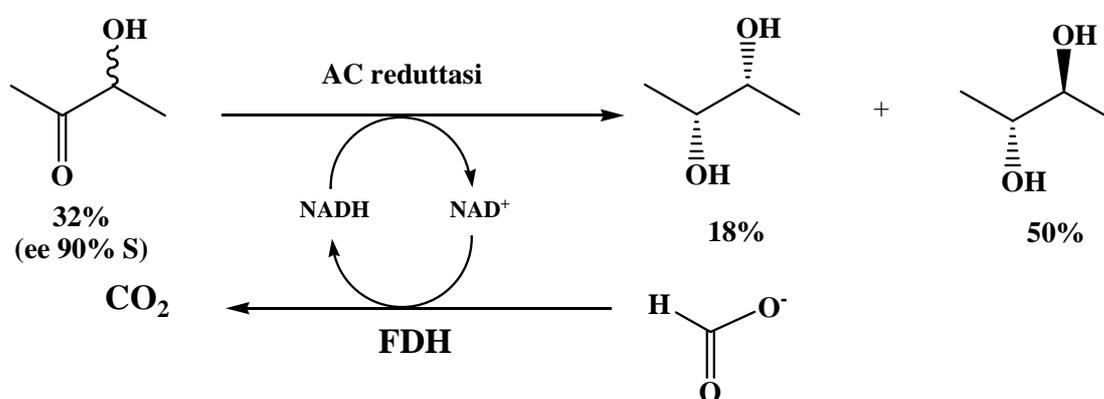


Schema 6. Reazioni catalizzate dalla nuova AC reduttasi.

Attraverso l'analisi spettrofotometrica delle velocità di comparsa e scomparsa del NADH è stato possibile stabilire che l'enzima è in grado di catalizzare efficacemente la riduzione dell'AC racemico e del DAC da parte del NADH e l'ossidazione del *meso*-2,3-BD da parte del NAD⁺, ma non mostra alcuna attività sull'ossidazione dei due

enantiomeri otticamente attivi del 2,3-BD e similmente alla BSDR non è in grado di catalizzare l'ossidazione dell'AC.

Inoltre per capire se l'enzima manifestasse una diversa specificità nei confronti dei due enantiomeri dell'AC, non essendo essi disponibili in commercio in forma otticamente pura, è stata eseguita una riduzione dell'AC racemico in presenza di un eccesso di NADH garantito da un sistema di riciclo del cofattore. Dopo un tempo di reazione più che sufficiente alla completa riduzione dell'AC, la reazione è stata estratta ed analizzata per via gascromatografica. L'analisi ha evidenziato la completa riduzione dell' *R*-AC con formazione di *meso*-2,3-BD e la parziale riduzione del *S*-AC con formazione di 2*S*,3*S*-BD. Lo Schema 7 riporta le composizione finale della miscela di reazione.



Schema 7. Riduzione dell'AC racemico catalizzata dalla nuova AC reduttasi

Questi risultati suggeriscono che l'enzima parzialmente purificato sia una AC-reduttasi estremamente efficiente nel catalizzare reversibilmente la riduzione del *R*-AC da parte del NADH con formazione di *meso*-BD.

Con la presenza di queste due enzimi (i.e. BSDR ed AC-reduttasi) entrambi *S*-stereospecifici viene spiegata la presenza nel brodo di fermentazione di *meso*-BD ma rimane ancora da verificare come si forma il 2*R*,3*R*-BD.

A tale proposito possiamo dire di avere verificato la presenza nell'estratto cellulare del *B. stearotherophilus* di una deidrogenasi NAD⁺ dipendente in grado di catalizzare l'ossidazione di questo enantiomero, ma le prove di purificazione di tale enzima eseguite finora non sono ancora approdate a risultati significativi.

Un ulteriore aspetto che emerge dalla letteratura sulla produzione batterica di 2,3-BD è la presenza in alcuni di batteri, appartenenti ai generi *Bacillus* e *Micrococcus*, di un

ulteriore via metabolica indicata col nome di “ciclo del butandiolo” e coesistente con la via catabolica. Per confermare la presenza di tale “ciclo” nel *B. stearothermophilus* abbiamo verificato la capacità del batterio di produrre acetilacetoino (AAC), un intermedio di questo ciclo. Basandoci su lavori svolti precedentemente con *B. cereus*⁹ abbiamo effettuato una biotrasformazione a carico del diacetile (DAC) facendo crescere il batterio in un terreno di coltura contenente acetoino come fonte di carbonio e quindi in grado di indurre la produzione degli enzimi presenti in questa seconda via. Dopo 24 h di crescita si effettua l’aggiunta di diacetile (10 gr/l) e la biotrasformazione viene continuata per 24 h. L’analisi gascromatografica della miscela ha mostrato la presenza di un prodotto diverso dall’AC, dal DAC e dal 2,3-BD (Figura 2).

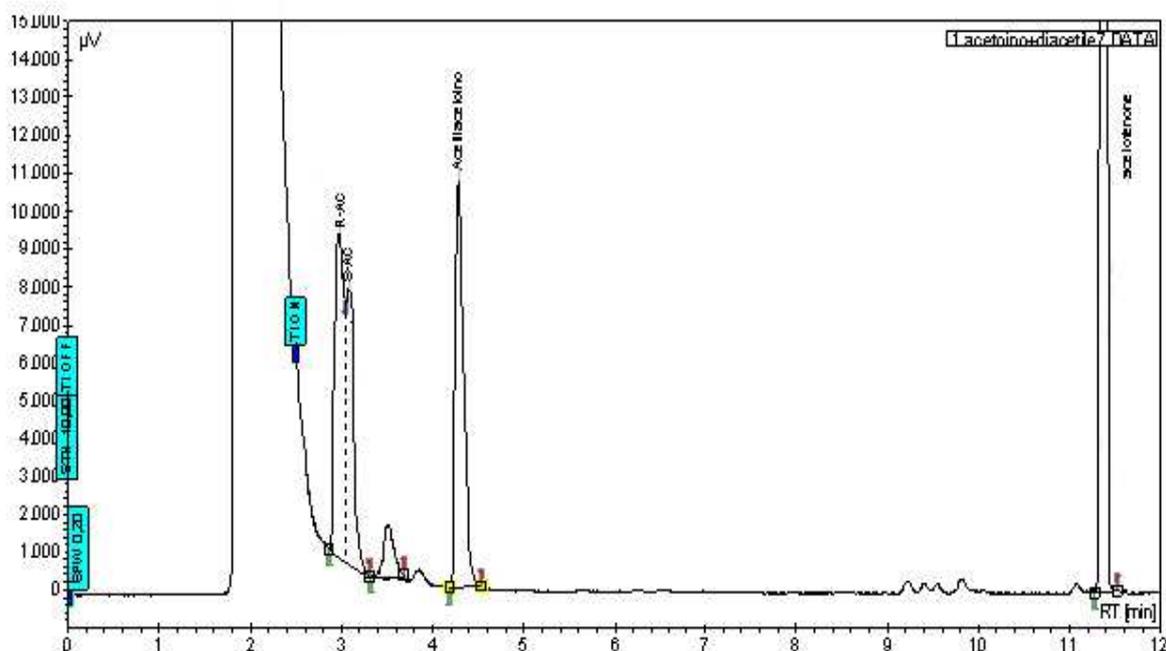
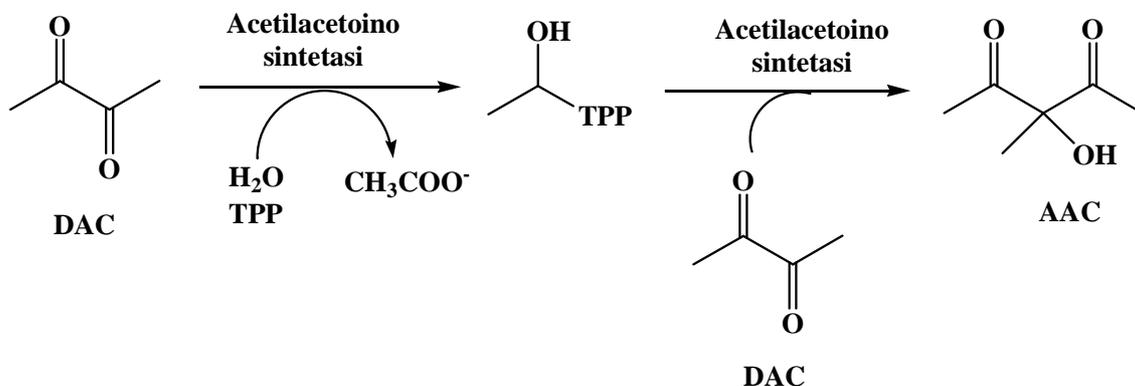


Figura 2. Gascromatogramma dei prodotti della biotrasformazione di diacetile

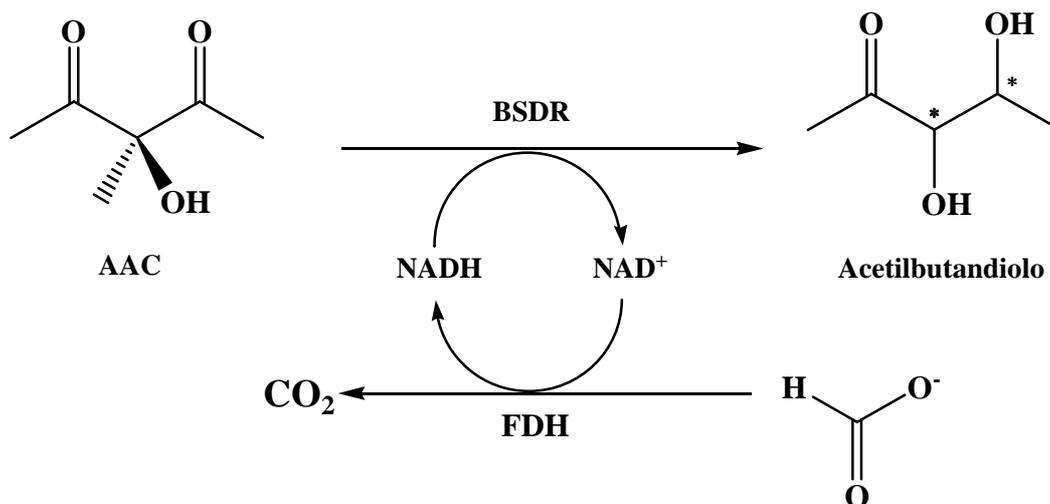
Tale prodotto è stato estratto con etil acetato e purificato per cromatografia su colonna di silice. L’analisi ¹H-NMR del composto purificato ha permesso di determinarne la struttura confermando che si trattava dell’acetilacetoino (AAC). Dal momento che l’estrazione e la purificazione non garantiscono un recupero ottimale del prodotto l’AAC purificato è stato utilizzato per costruire una curva di calibrazione (con standard interno) per avere un’analisi gascromatografica quantitativa.

E' stato così determinato che la concentrazione di AAC nella biotrasformazione è di 0.8 g/l per una resa di biotrasformazione del 12 % (considerando che la stechiometria della reazione è $2AC \rightarrow 1AAC$) (Schema 8).



Schema 8. Biosintesi dell'AAC partendo dal DAC

Questo esperimento ci permette di dire che nel *B. stearothermophilus* è presente una AAC-sintetasi la cui espressione è indotta dalla presenza di AC nel terreno di coltura. Questo enzima, in grado di catalizzare la sintesi di AAC a partire dal DAC, un importante marker a sostegno della presenza del “ciclo del butandiolo”. Tale ciclo prevede anche la presenza di AAC-reduttasi NADH o NADPH dipendenti ma questi enzimi possono presentare una specificità di substrato ampia ed accettare come substrato altri composti strutturalmente simili tipo l’AC, pertanto la presenza di un enzima in grado di catalizzare la riduzione dell’AAC da parte del NADH o del NADPH non può essere da sola considerata significativa della presenza del ciclo del butandiolo. A tale riguardo abbiamo infine misurato l’efficienza catalitica della BSDR e della nuova AC-reduttasi parzialmente purificata nella reazione di riduzione dell’AAC da parte del NADH. Attraverso la semplice misurazione della velocità di reazione per via spettrofotometrica (scomparsa del NADH) è stato possibile capire che la nuova AC-reduttasi non è in grado di catalizzare la riduzione di AAC, mentre BSDR mostra una velocità di reazione paragonabile a quella che si osserva in presenza del DAC. Al fine di accertare la struttura del prodotto di riduzione la reazione è stata condotta su scala semipreparativa (0.1 g di AAC) con un eccesso di NADH garantito dal riciclo del cofattore (Schema 9).



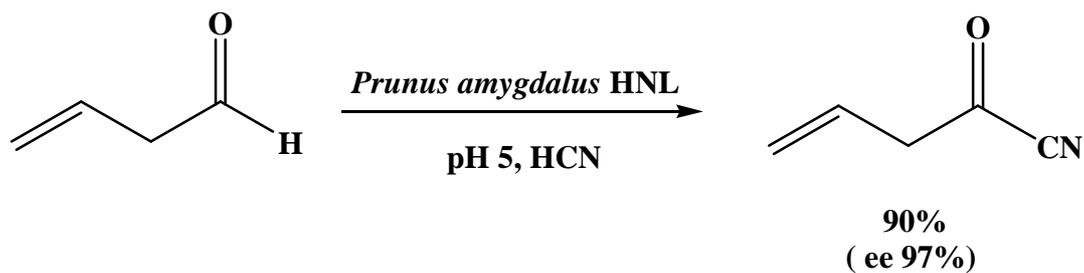
Schema 9. Riduzione su scala preparativa dell'AAC catalizzata da BSDR

Il prodotto è stato estratto con etile acetato e dopo evaporazione del solvente è stato analizzato per ¹H-NMR e identificato come l'acetilbutandiolo confermando l'ipotesi che la reazione interessa uno solo dei gruppi carbonilici presenti in AAC.

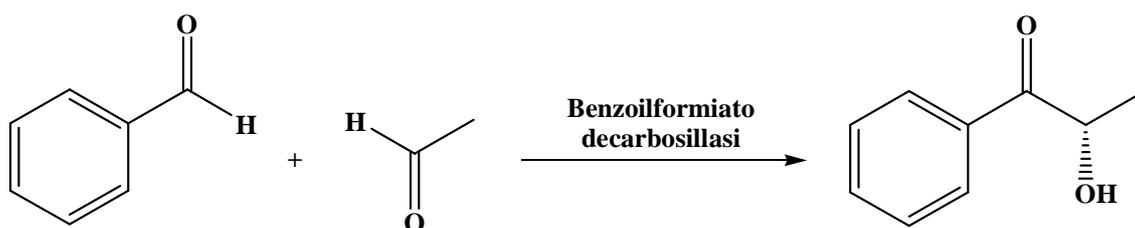
Applicazioni biocatalitiche

Lo studio della via metabolica ha permesso di mettere in luce l'esistenza di enzimi potenzialmente sfruttabili per applicazioni biocatalitiche. La nostra attenzione si è focalizzata sull'AAC-sintetasi in grado di formare legami carbonio-carbonio.

Lo sviluppo di metodi efficienti e stereoselettivi per la formazione di legami carbonio-carbonio da sempre rappresenta uno dei principali campi di ricerca della chimica organica di sintesi. Molte delle strategie messe a punto prevedono l'impiego di catalizzatori e/o reattivi a base di metalli, solventi organici e spesso drastiche condizioni di reazione che ne limitano l'impiego su scala industriale. Per questi motivi, l'attenzione di molti ricercatori si è spostata sulla possibilità di utilizzare un approccio biocatalitico, almeno per certe categorie di composti. Gli enzimi più usati per la formazione di legami carbonio-carbonio, sono indubbiamente le idrossinitrilasi e la famiglia degli enzimi tiamminadifosfato-dipendenti.³⁶ Mentre i primi catalizzano l'attacco di uno ione cianuro su di un gruppo carbonilico con formazione di una cianidrina (Schema 10), i secondi sono in grado catalizzare la formazione di α -idrossichetoni attraverso l'attacco di un gruppo aldeidico attivato su di un secondo gruppo carbonilico (Schema 11).



Schema 10. Formazione legame carbonio-carbonio via cianidrina



Schema 11. Formazione di legame carbonio-carbonio via gruppi aldeidici attivati

L'attivazione del gruppo aldeidico avviene grazie all'intervento del cofattore tiammina difosfato o tiammina pirofosfato (TPP) (Figura 3) ed in particolare grazie all'attacco nucleofilo da parte del carbonio in posizione C₂ dell'anello tiazolidinico deprotonato **X** nei confronti del gruppo carbonilico dell'aldeide **Y** con formazione dell'intermedio attivato **J** (Schema 12).

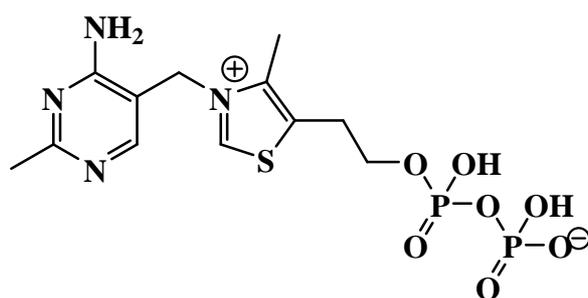
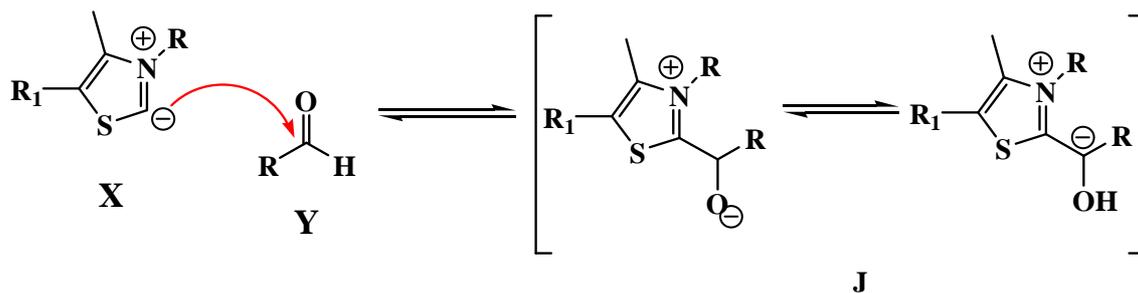


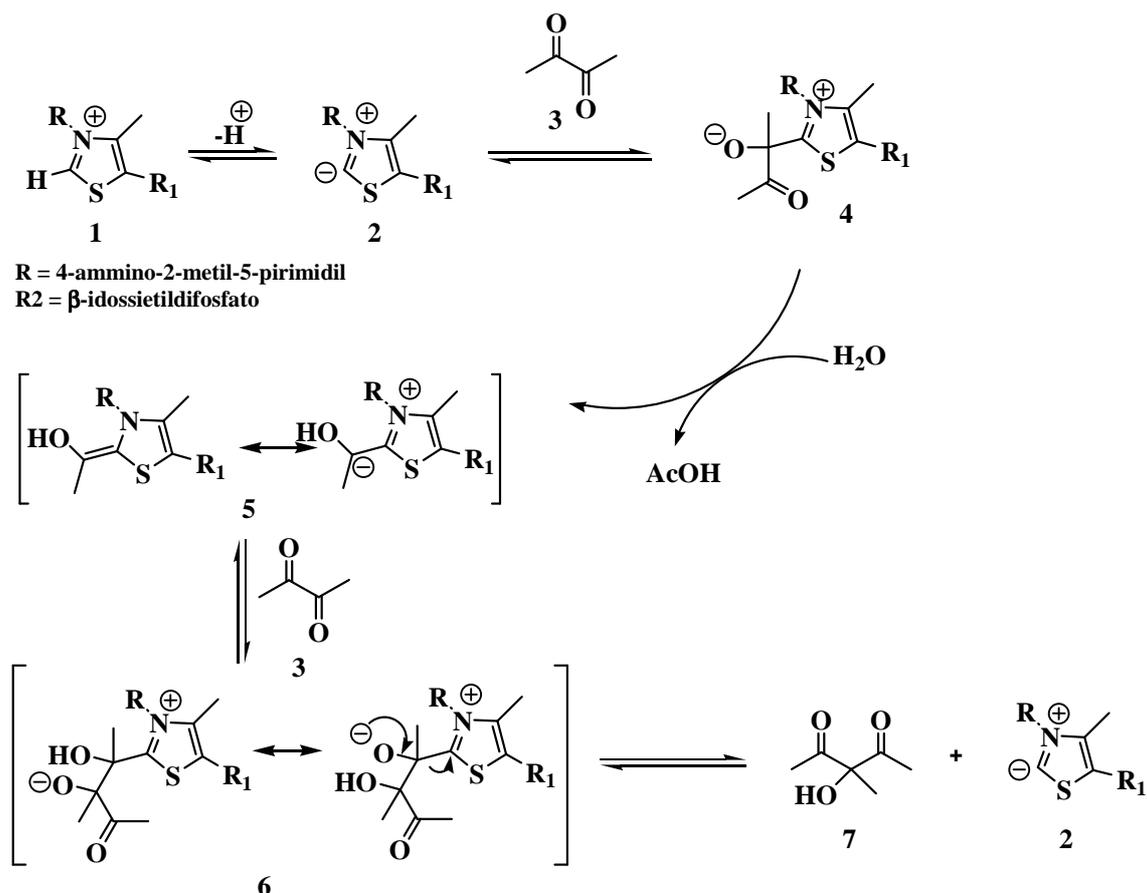
Figura 3. Tiammina difosfato



Schema 11. Formazione dell'intermedio attivato

Tale intermedio presenta una particolare distribuzione di carica che determina un'alta densità elettronica sull'atomo di carbonio dell'ex gruppo aldeidico tale da conferirgli il carattere nucleofilo proprio di un carbanione. L'attacco nucleofilo di questo carbanione sul secondo composto carbonilico porterà alla formazione del nuovo legame carbonio-carbonio dell' α -idrossichetone.

L'acetilacetoino sintasi appartiene al gruppo degli enzimi TPP-dipendenti e il suo substrato naturale è rappresentato dal 2,3-butandione o diacetile. Il primo passaggio del ciclo catalitico di questo enzima prevede l'attacco dell'anello tiazolidinico deprotonato della TPP su uno dei due gruppi carbonilici equivalenti del diacetile (Schema 13).



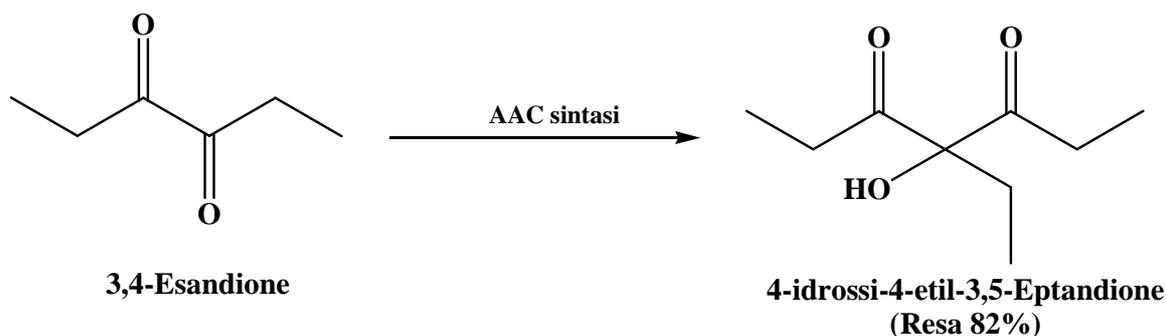
Schema 13. Ciclo catalitico dell'AAC-Sintetasi

L'intermedio **4** che ne deriva subisce successivamente l'idrolisi dovuta all'attacco da parte di una molecola d'acqua che porta alla formazione dell'intermedio carbanionico idrossietil-TPP **5** ed al rilascio di una molecola di acido acetico. Il sito catalitico a questo punto è pronto a ricevere una seconda molecola di diacetile che subirà l'attacco da parte del carbanione con la formazione del nuovo legame C-C dell'intermedio **6**. A seguito di un riarrangiamento molecolare verranno infine liberati l'acetilacetoino e la TPP nella sua forma deprotonata.

L'estratto cellulare grezzo del *B. stearotermophilus*, ottenuto trattando ad alte pressioni (French press) una sospensione di cellule in tampone fosfato a pH 6.5, si è dimostrato in grado, in presenza di TPP ed MgSO_4 , di catalizzare efficacemente la formazione dell'acetilacetoino dal diacetile. La formazione del prodotto può essere facilmente seguita per analisi gascromatografica e sono state verificate conversioni superiori all'80%. Questi dati sperimentali ci hanno suggerito di verificare la capacità dell'AAC-Sintetasi di accettare come substrato anche 1,2-dichetoni diversi dal diacetile. La scelta

è ricaduta su due dichetoni facilmente reperibili in commercio e cioè il 3,4-esandione e l'1-fenil-1,2-propandione .

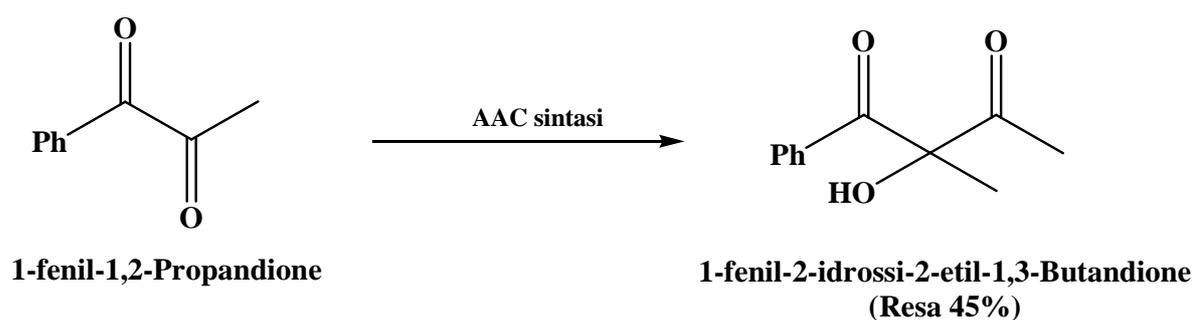
Abbiamo osservato che l'AAS accetta come substrato il 3,4-esandione catalizzando efficacemente la formazione del 4-idrossi-4-etil-3,5-eptandione con conversioni pressoché quantitative (Schema 14).



Schema 14. Condensazione del 3,4-Esandione

Il prodotto ottenuto è stato isolato e caratterizzato.

Anche l'1-fenil-1,2-propandione viene accettato come substrato, sebbene l'AAC-S intetasi manifesti un'efficienza catalitica inferiore a quella mostrata nei confronti del diacetile e del 3,4-esandione. Il prodotto 1-fenil-2-idrossi-2-etil-1,3-butandione viene formato con una conversione del 45 % (Schema 15).



Schema 15. Condensazione del 1-fenil-1,2-Propandione

Questo prodotto, rispetto al precedente, contiene un centro di asimmetria (C-3) pertanto potrebbe esistere in 2 forme enantiomeriche. Il prodotto cromatografato su colonna di

gel di silice è risultato puro all'analisi ^1H NMR. L'analisi gascromatografica con colonna chirale del prodotto purificato mostra la presenza di due picchi ravvicinati che potrebbero rappresentare con buona probabilità i due enantiomeri. E' pertanto possibile ipotizzare che ci troviamo in presenza di una sintesi asimmetrica caratterizzata da un eccesso enantiomerico del 40%. Queste ipotesi ricevono una conferma dall'analisi polarimetrica del campione puro che restituisce un potere ottico rotatorio diverso da zero, $[\alpha]_{\text{D}} = +12.4$ (c 0.5, CH_2Cl_2).

Per la determinazione della configurazione assoluta saranno necessari esperimenti volti alla separazione su scala semipreparativa (10-100 mg) dei due enantiomeri (conversione in diastereoisomeri, riduzione enantioselettiva, HPLC-chirale semipreparativo), e la purezza ottica andranno verificate con opportuni studi spettroscopici (NMR, raggi X)

I prodotti ottenuti rappresentano potenziali intermedi di sintesi grazie alla loro polifunzionalità e alle caratteristiche stereochemiche.

In conclusione il mio lavoro di tesi ha permesso di ottenere dati preliminari sul processo fermentativo di *Bacillus stearotherophilus* che è in grado di produrre butandiolo con buone rese utilizzando saccarosio o prodotti di scarto che lo contengono quali melasso di canna.

D'altra parte l'analisi dei prodotti ha permesso lo studio della via metabolica che porta alla formazione di *R*-acetoino, *2R,3R*- e *meso*-butandiolo. E' stata confermata la presenza di una via catabolica che partendo dal piruvato, attraverso la formazione di acetoino, produce butandiolo e la presenza del "ciclo del butandiolo" che dal diacetile, attraverso la formazione di acetilacetoino, dopo riduzione ed idrolisi fornisce il medesimo metabolita.

Sono stati individuati due nuovi enzimi, una acetoino-reduttasi *S*-stereospecifica, che è stata parzialmente purificata, e una acetil-acetoino sintetasi che è stata utilizzata nella sintesi stereospecifica di α -idrossi-1,3-dichetoni partendo da 1,2-dichetoni diversi dal diacetile.

Rimane ancora aperta la ricerca dell'AC-reduttasi *R*-stereospecifica in grado di produrre *2R,3R*-butandiolo.

In sintesi questo lavoro di tesi ha dato luogo alle pubblicazioni che sono di seguito riportate.

Bibliografia

P. P. GIOVANNINI, M. MANTOVANI, A. MEDICI, P. PEDRINI– Productions of 2,3-butandiol by *Bacillus sterothermophilus*: fermentation and metabolic pathway. Proceedings of IBIC 2008, *Chem. Eng. Transactions*, **14**, 281-286 (2008).

P.P. GIOVANNINI, M. MANTOVANI, M. FOGAGNOLO, S. MAIETTI, A. MEDICI, P. PEDRINI – *Bacillus stearothermophilus* fermentation: the enzymatic route to 3*R*-hydroxy-2-butanone and *meso*-and 2*R*,3*R*-butanediol. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, in stampa.

P.P. GIOVANNINI, M. MANTOVANI, A. MEDICI, P. PEDRINI - Enzymatic carbon-carbon bond formation: synthesis of α -hydroxy-1,3-diketones from the corresponding 1,2-diketones. *Organic Letters*, in stampa.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Giovannini, P. P.; Hanau, S.; Rippa, M.; Bortolini, O.; Fogagnolo, M.; Medici, A. (1996): *Bacillus stearothermophilus* alcohol dehydrogenase: a new catalyst to obtain enantiomerically pure bicyclic octen- and hepten-ols and -ones. *Tetrahedron*, **52**, 1669-1676.
2. Yamazaki, Y.; Maeda, H. (1986): Enzymatic synthesis of optically pure (R)- (-)-mandelic acid and other 2-hydroxycarboxylic acids: screening for the enzyme, and its purification, characterization and use. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2621-2631.
3. Findeis, M. A.; Whitesides, G. M. (1987): Fumarase-catalyzed synthesis of L-threo-chloromalic acid and its conversion to 2-deoxy-D-ribose and D-erythro-sphingosine. *J. Org. Chem.*, **52**, 2838-2848.
4. Schoevert, R.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. (2001): Facile enzymatic aldol reactions with dihydroxyacetone in the presence of arsenate. *J. Org. Chem.*, **66**, 4559-4562.
5. de Mas, C.; Jansen, N. B.; Tsao, G. T. (1988): Production of optically active 2,3-butanediol by *Bacillus polymixa* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 366-377.
6. Johansen, L.; Larsen, S. H.; Stormer, F. C. (1973): Diacetyl (acetoin) reductase from *Aerrobacter aerogenes* - kinetic studies of the reduction of diacetyl to acetoin. *Eur. J. Biochem.*, **34**, 97-99.
7. Ui, S.; Masuda, T.; Masuda, H.; Muraki, H. (1986): Mechanism for the formation of 2,3-butanediol stereoisomers in *Bacillus polymixa*. *J. Ferm. Technol.*, **64**, 481-486.
8. Juni, E.; Heym, G. A. (1956): A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetylmethylcarbinol and diacetyl. I. General aspects of the 2,3-butanediol cycle. *J. Bacteriol.*, **71**, 425-432.

9. Ui, S.; Hosaka, T.; Watanabe, K.; Mimura, A. (1998): Discovery of a new mechanism of 2,3-butanediol stereoisomer formation in *Bacillus cereus* YUF-4. *J. Ferm. Bioeng.*, **85**, 79-83.
10. Ramachandran, K. B.; Goma, G. (1988): 2,3-Butanediol production from glucose by *Klebsiella pneumonia* in a recycle system. *J. Biotechnol.*, **9**, 39-46.
11. Moes, J.; Griot, M.; Keller, J.; Heinzle, E.; Dunn, I. J.; Bourne, J. R. (1985): A microbial culture with oxygen sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 482-489.
12. Olson, B. H.; Johnson, M. J. (1948): The production of 2,3-butylene glycol by *Aerobacter aerogenes* 199. *J. Bacteriol.*, **55**, 209-222.
13. Saha, B. C.; Bothast, R. J. (1999): Production of 2,3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 321-326.
14. Ui, S.; Masuda, H.; Muraki, H. (1983): Laboratory-scale production of 2,3-butanediol isomer D(-), L(+), and *meso* by bacterial fermentations. *J. Ferm. Tachnol.*, **61**, 253-259.
15. Ui, S.; Okajima, Y.; Mimura, A.; Kanai, H.; Kudo, T. (1997): Molecular generation of an *Escherichia coli* strain producing only the *meso*-isomer of 2,3-butanediol. *J. Ferm. Bioeng.*, **85**, 79-83.
16. Lee, H. K.; Maddox, I. S. (1986): Continuous production of 2,3-butanediol from whey permeate using *Klebsiella pneumoniae* immobilized in calcium alginate. *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 409-411.
17. Biebl, H.; Zeng, A. P.; Menzel, K.; Deckwer, W. D. (1998): Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butandiol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 24-29.

18. Cao, N. G.; Xia, Y. K.; Gong, C. S.; Tsao, G. T. (1997): Production of 2,3-butanediol from pretreated corn cob by *Klebsiella oxytoca* in the presence of fungal cellulose. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **63/65**, 129-139.
19. Perlman, D. (1944): Production of 2,3-butylene glycol from wood hydrolyzates. *Ind. Eng. Chem.*, **36**, 803-804.
20. Kooi, E. R.; Fulmer, E. I.; Underkofler, L. A. (1948): Production of 2,3-butanediol by fermentation of cornstarch. *Ind. Eng. Chem.*, **40**, 1440-1445.
21. Alam, S.; Capit, F.; Weigand, W. A.; Hong, J. (1990): Kinetics of 2,3-butanediol fermentation by *Bacillus amyloliquefaciens*: effect of initial substrate concentration and aeration. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **47**, 71-84.
22. Eiteman, M. A.; Miller, J. H. (1995): Effect of succinic acid on 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnol. Lett.*, **17**, 1057-1062.
23. 23) Stormer, F. C. (1977): Evidence for regulation of *Aerobacter aerogenes* pH 6 acetolactate-forming enzyme by acetate ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 898-902.
24. Ramachandran, K. B., Goma, G. (1987): Effect of oxygen supply and dilution rate on the production of 2,3-butanediol in continuous bioreactor by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 107-111.
25. Nakashimada, Y., Kanai, K., Nishio, N. (1998): Optimization of dilution rate, pH, and oxygen supply on optical purity of 2,3-butanediol produced by *Paenibacillus polymyxa* in chemostat culture. *Biotechnol. Lett.*, **20**, 1133-1138.
26. Qureshi, N.; Maegher, M. M.; Hutkins, R. W. (1994): Recovery of 2,3-butanediol by vacuum membrane distillation. *Sept. Sci. Technol.*, **29**, 1733-1748.

27. Tsao, G. T. (1978): Conversion of biomass from agriculture into useful products. Final Report, USDDE Contract No. EG-77-S-02-4298
28. Garg, S. K. (1995): Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. *Bioresour. Technol.*, **51**, 103-109.
29. Welker, N. E.; Leon Campbell, L. (1963): Effect of carbon sources on formation of α -amylase by *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.*, **86**, 681-686.
30. 30) Kallwass, H. K. W., Luyten, M. A., Parris, W., Gold, M., Kay, C.M., Jones, J. B. (1992): Effects of Gln102Arg and Cys97Gly mutations on the structural specificity and stereospecificity of the L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4551-4557.
31. Fantin., G.; Fogagnolo, M.; Medici, A.; Pedrini, P.; Rosini, G. (1994): Kinetic resolution via oxidation of *endo*-bicyclic octen- and heptenols with *Bacillus stearothermophilus*. *Tetrahedron: Asymmetry*, **5**, 1635-1638.
32. Fantin., G.; Fogagnolo, M.; Medici, A.; Pedrini, P.; Poli, S. (1993): Microbial oxidation with *Bacillus stearothermophilus*: high Enantioselective resolution of 1-heteroaryl and 1- aryl alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 1607-1612.
33. Fantin., G.; Fogagnolo, M.; Giovannini, P. P.; Medici, A.; Pedrini, P.; Poli, S. (1995): Oxidation with *Bacillus stearothermophilus* in heptane. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 441-442.
34. Giovannini, P. P.; Medici, A.; Bergamini, C. M.; Rippa, M. (1996): Properties of diacetyl(acetoin)reductase from *Bacillus stearothermophilus*. *Bioorg. Med. Chem.*, **4**, 1197-1201.

- 35.** Mori, Y.; Hirano, T.; Natomi, T. (2006): Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnol.*, **6**, 3-7.
- 36.** Sukumaran, J.; Hanefeld, U. (2004): Enantioselective C-C bond synthesis catalysed by enzymes. *Chem. Soc. Rev.*, **34**, 530-542.