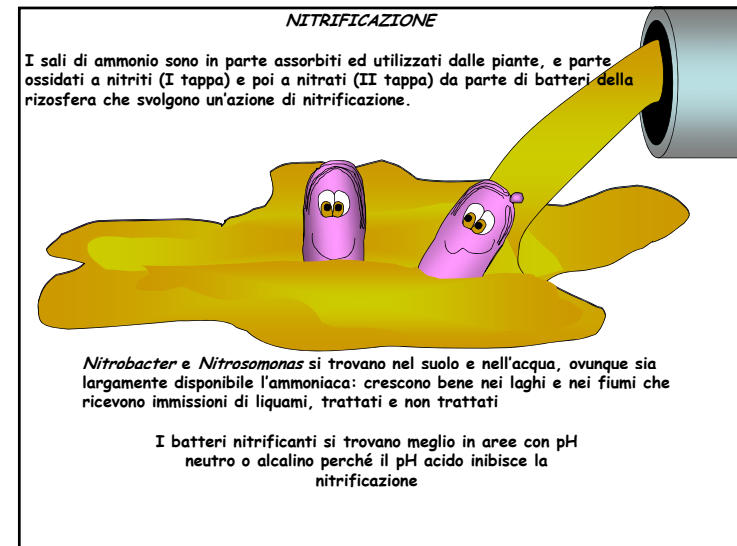
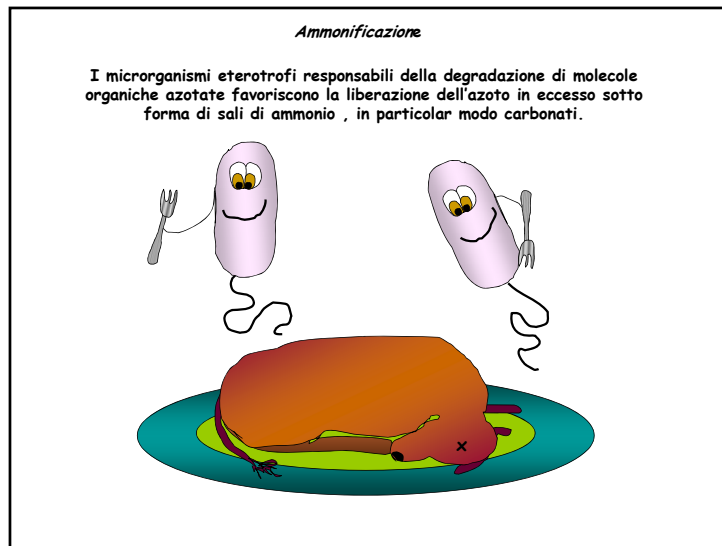
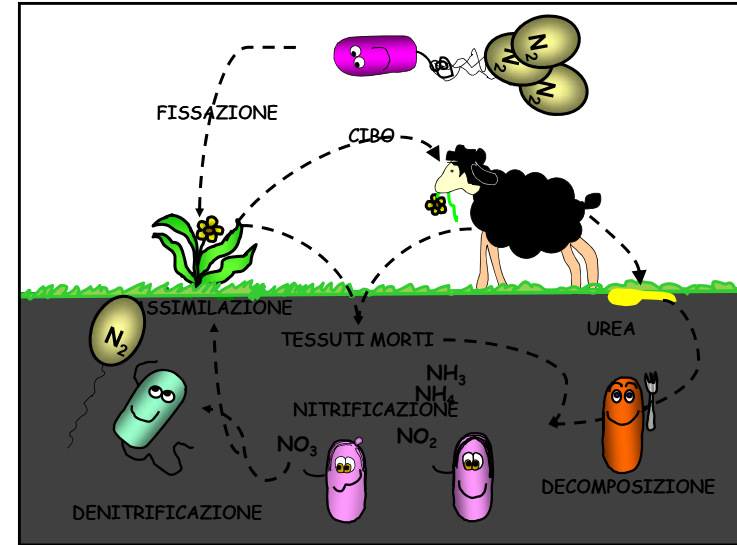
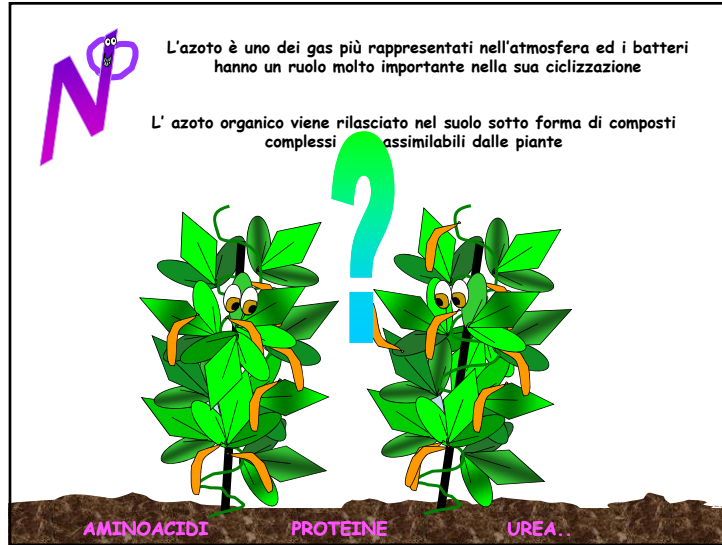
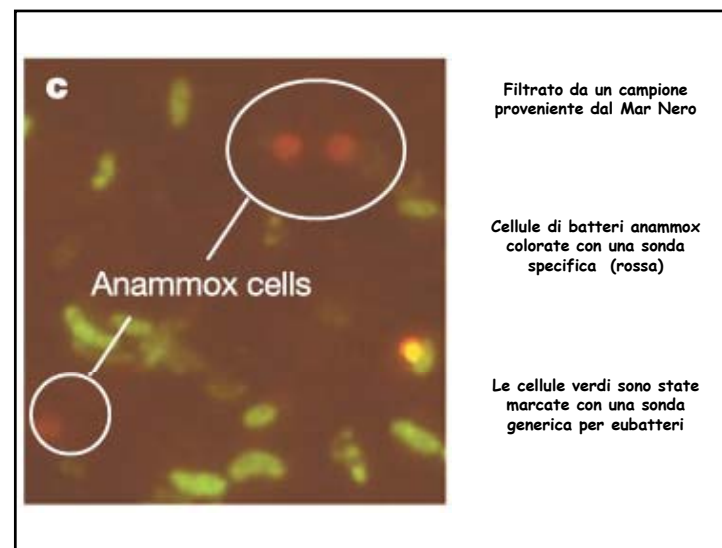
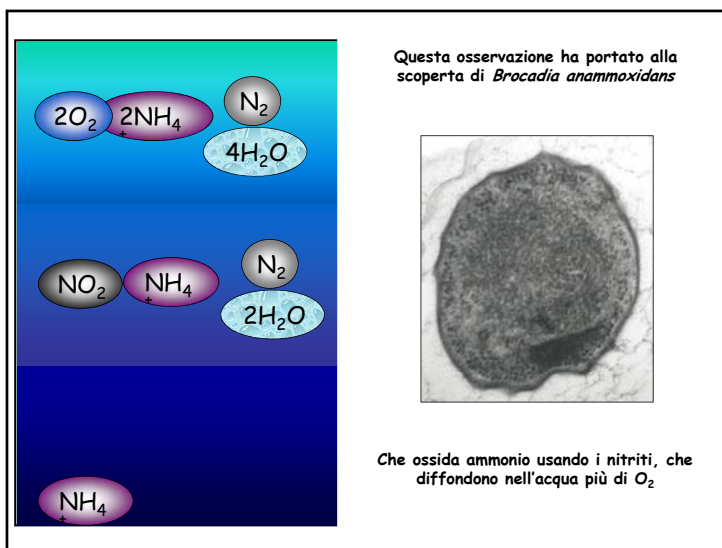
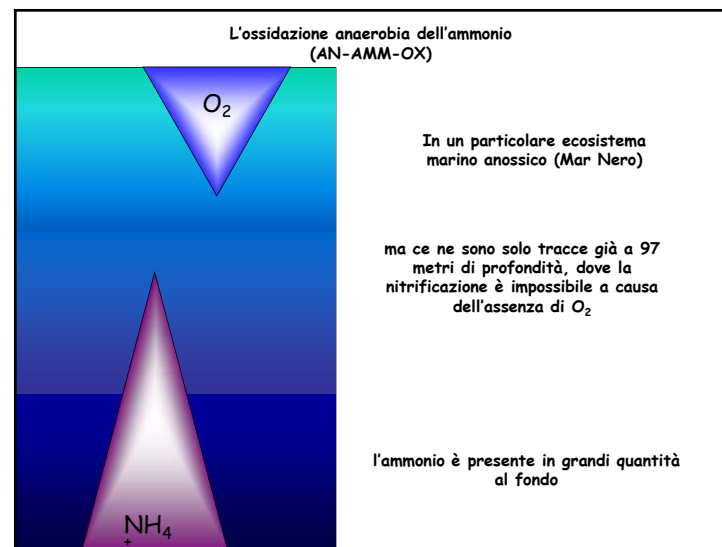
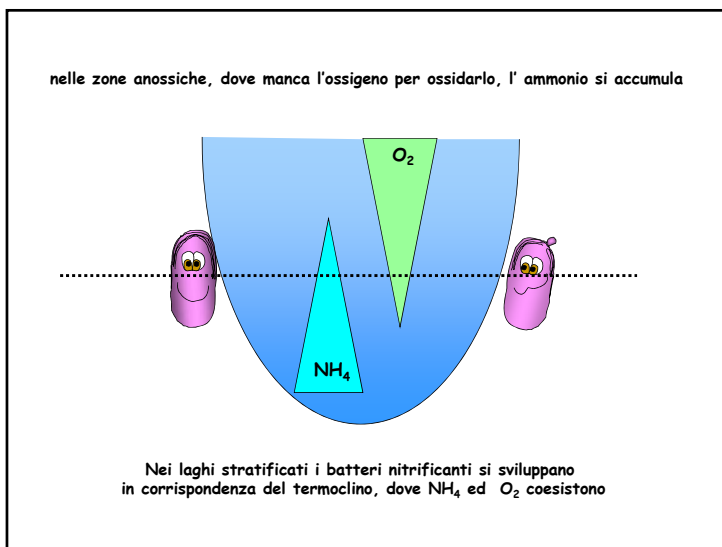
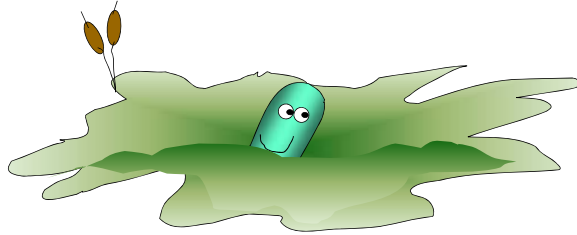




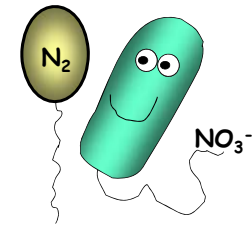


DENITRIFICAZIONE

Nei terreni poco aerati, i nitrati sono in parte ridotti da alcuni microrganismi, con formazione di N_2O e N_2 , che si disperdono nell'atmosfera

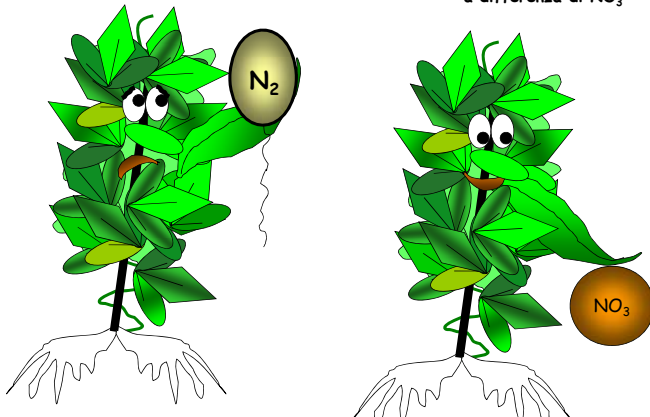


I batteri denitrificanti utilizzano nitrati come accettori di elettroni in reazioni dissimilative



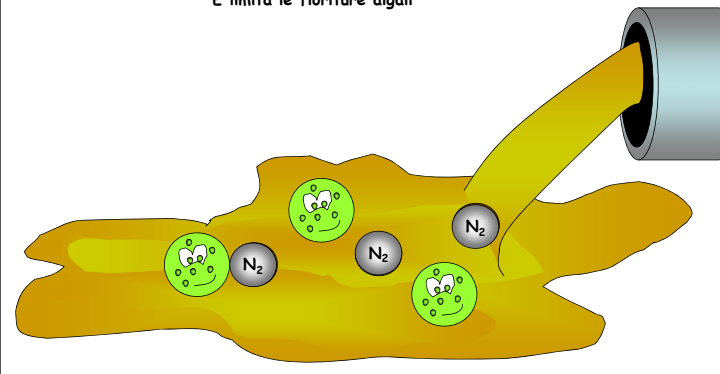
il processo di denitrificazione è svantaggioso nei terreni agricoli, perché N_2 non è disponibile per l'utilizzazione da parte delle piante

a differenza di NO_3



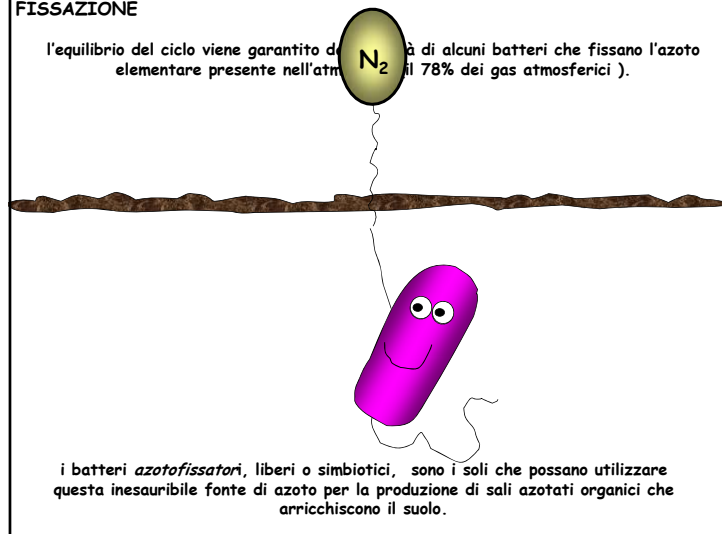
è invece vantaggioso nel trattamento delle acque di scarico, perché diminuisce il carico di azoto disciolto

E limita le fioriture algali



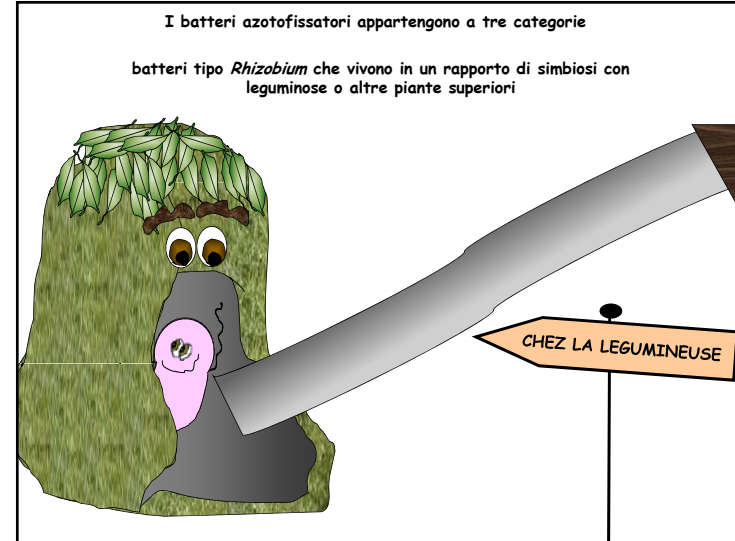
FISSAZIONE

l'equilibrio del ciclo viene garantito dalla presenza di alcuni batteri che fissano l'azoto elementare presente nell'atmosfera (il 78% dei gas atmosferici).

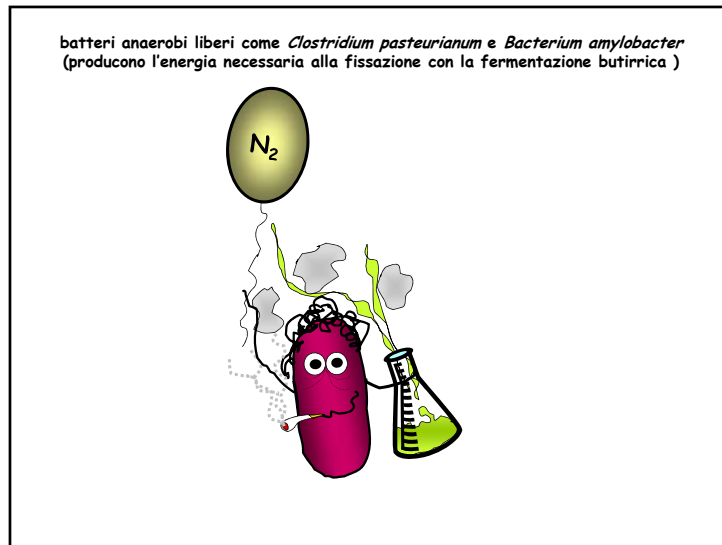


I batteri azotofissatori appartengono a tre categorie

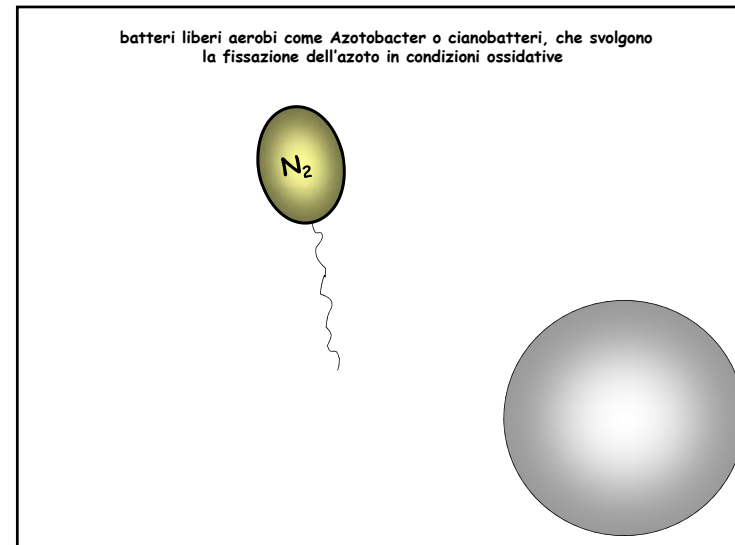
batteri tipo *Rhizobium* che vivono in un rapporto di simbiosi con leguminose o altre piante superiori



batteri anaerobi liberi come *Clostridium pasteurianum* e *Bacterium amylobacter* (producono l'energia necessaria alla fissazione con la fermentazione butirrica)



batteri liberi aerobi come *Azotobacter* o cianobatteri, che svolgono la fissazione dell'azoto in condizioni ossidative



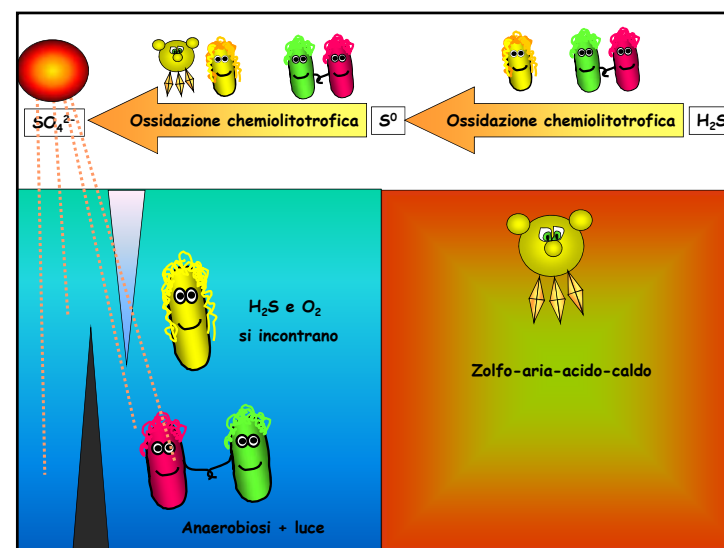
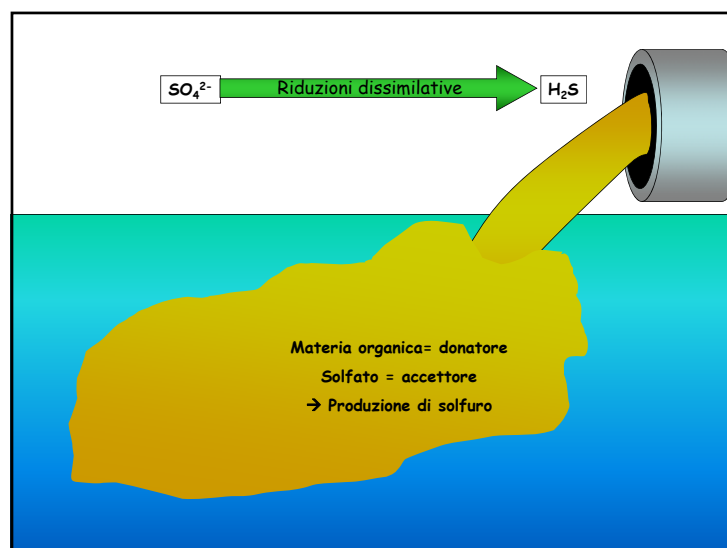
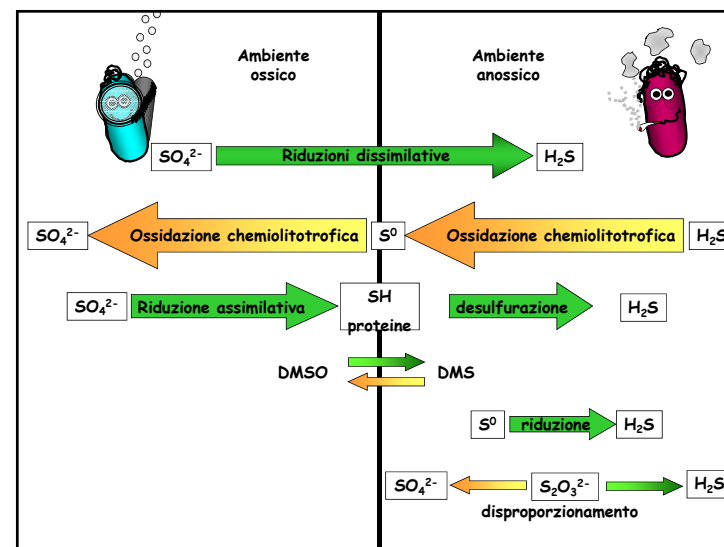
Nel CICLO DELLO ZOLFO i microrganismi hanno un ruolo essenziale

Anche se sussistono molte reazioni veloci che sono chimiche e non biologiche

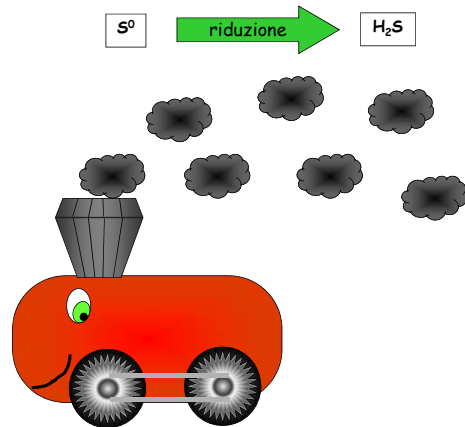
Lo zolfo è presente in diversi stati di ossidazione

Le forme più comuni sono

0	zolfo elementare (S^0)
-2	sulfidrilico (R-SH); solfuro (HS^-)
+6	solfato (SO_4)



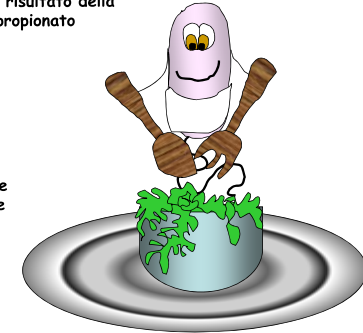
Solo pochi batteri anaerobi (*Desulfuromonas*) e diversi archibatteri ipertermofili sono capaci di ridurre lo zolfo elementare a solfuro



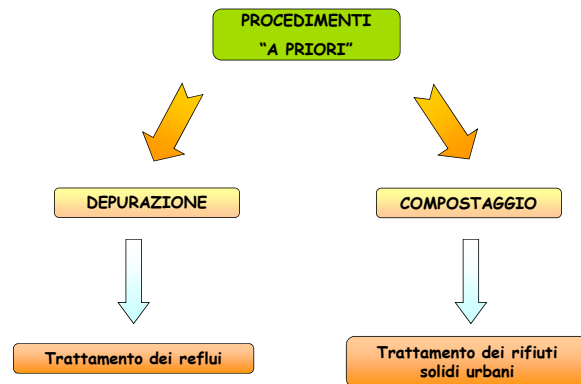
Il composto organico più abbondante in natura è il dimetilsolfuro (DMS)

prodotto negli ambienti marini come risultato della degradazione del dimetilsolfonpropionato

dimetilsolfonpropionato è il principale composto osmoregolatore delle alghe

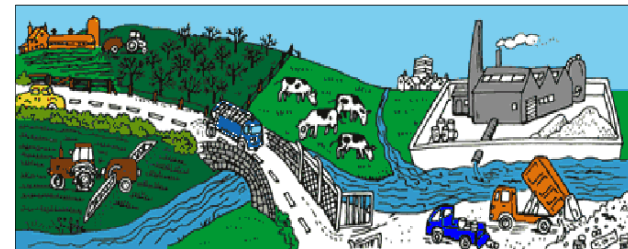


MICRORGANISMI E TRATTAMENTO DELL'INQUINAMENTO



DEPURAZIONE

Le acque di scarico provengono da scarichi domestici o processi industriali, o dall'agricoltura

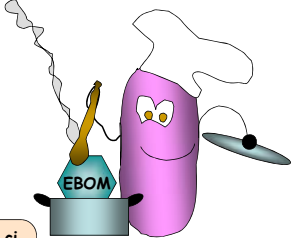


per motivi di sanità pubblica, e di equilibrio dell'ambiente, non possono essere immessi in corsi d'acqua senza essere stati prima depurati

I microrganismi hanno un ruolo chiave nel trattamento delle acque di scarico

La parte inorganica dei detriti viene rimossa da trattamenti fisici e/o chimici

Ma per il trattamento della parte organica ci si affida ai microrganismi che ossidano e mineralizzano la EBOM (Easily Biodegradable Organic Matter)

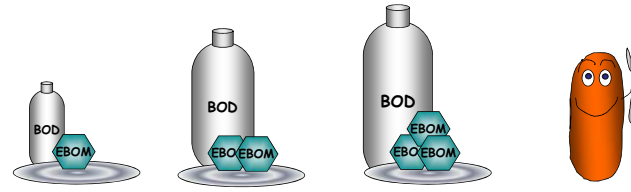


Per digerire la sostanza organica disciolta, i batteri hanno bisogno di ossigeno; questa necessità determina il BOD di un campione da trattare

BOD = Biochemical Oxygen Demand

Il valore del BOD è dato dalla quantità di ossigeno necessaria perchè i microrganismi digeriscano in 5 giorni una certa quantità di liquame

E' un modo di quantizzare la quantità di EBOM (e quindi di inquinamento) presente in un determinato campione di liquame. Quanto più alto il BOD tanto più inquinato da sostanza organica il campione che si sta esaminando

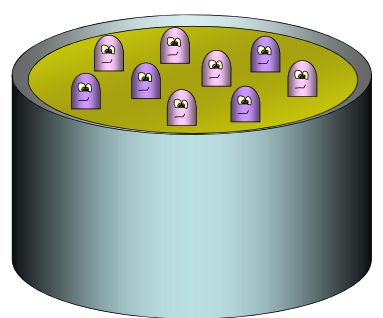


Un impianto di trattamento dei liquami può essere visto come un'enorme coltura microbica, in cui i microrganismi ossidano i componenti del "terreno" per ottenere energia e moltiplicarsi

In questo processo la maggior parte dei nutrienti vengono convertiti in composti chimici semplici come CO_2 , NO_3 , SO_4 , PO_4

Lo scopo di un impianto di trattamento di liquami è quello di provvedere le condizioni ottimali per selezionare ed utilizzare i microrganismi più idonei a convertire le EBOM in minerali

L'utilizzazione dei nutrienti è più efficiente in aerobiosi: gli impianti di trattamento dei liquami sono progettati per fornire O_2 in eccesso

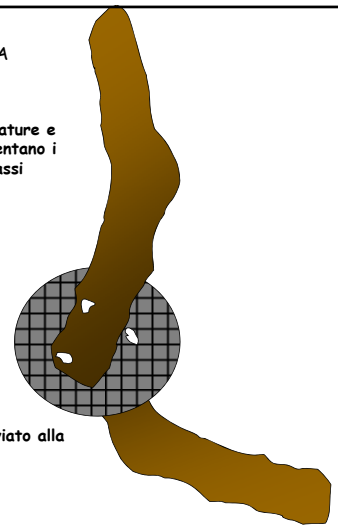


SETACCIATURA

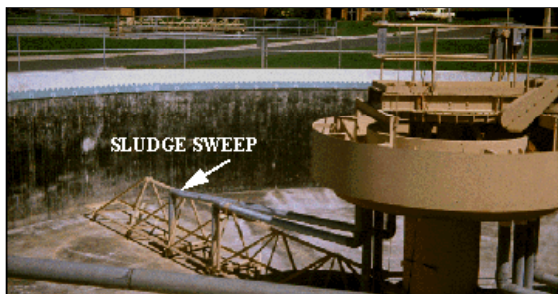
il liquame non trattato arriva dalle fognature e si raccoglie in un serbatoio, dove sedimentano i detriti più pesanti come ad es. i sassi

Poi viene fatto passare attraverso grate o griglie che fermano i detriti galleggianti più grandi come, ad esempio stracci o bastoni

La parte liquida (effluente) viene poi avviata alla prima vasca di sedimentazione



Dove il flusso del liquame rallenta e i rifiuti organici di maggiori dimensioni sedimentano e si depositano sotto forma di fango

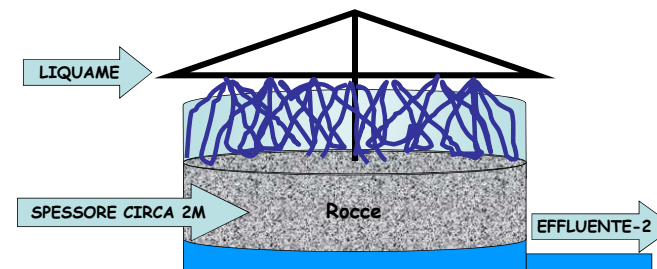


Al fondo del serbatoio il braccio rotante convoglia il fango sedimentato verso il centro della vasca, da dove viene rimosso

l'ossidazione della EBOM nella parte liquida può essere ottenuta con due differenti strategie

FILTRI PERCOLATORI

L'effluente fluisce lungo bracci che ruotano lentamente al disopra di un letto di rocce frantumate, su cui i microrganismi sono cresciuti in biofilm



Il liquame viene spruzzato in modo da saturarsi di ossigeno; la frantumazione grossolana permette all'aria di circolare tra le rocce

I microbi si nutrono della EBOM man mano che il liquame scorre attraverso il letto di rocce a cui sono adesi

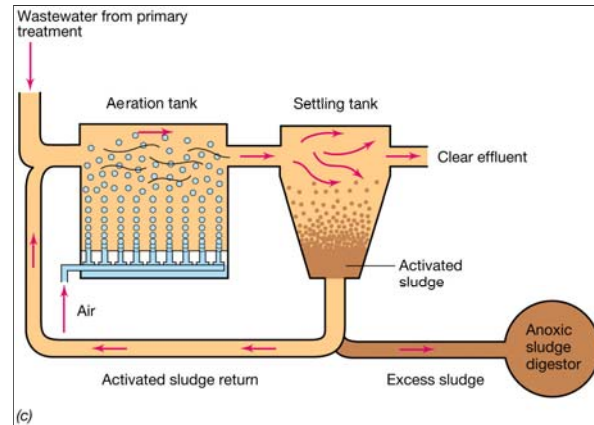


Il secondo effluente passa alla vasca di sedimentazione secondaria, insieme con frammenti di slime che si staccano dal biofilm



Vasca di sedimentazione secondaria: la struttura è la stessa di quella primaria

SISTEMA A FANGHI ATTIVI

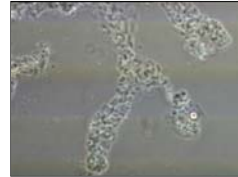
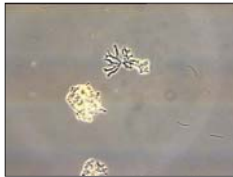


Nel sistema a fanghi attivi, al liquame che effluisce dalla prima vasca si aggiunge un inoculo microbico, composto da microrganismi che si sono auto-selezionati per la loro capacità di crescere rigogliosamente nel liquame grezzo

La selezione viene operata raccogliendo il fango depositato nella vasca di sedimentazione secondaria e mischiandolo (10% finale circa) con l'effluente che arriva dalla prima vasca di sedimentazione

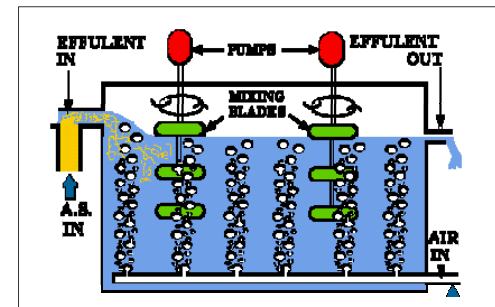


Il fango è costituito da grossi ammassi gelatinosi (fiocchi) di microrganismi cresciuti nei serbatoi di aerazione.

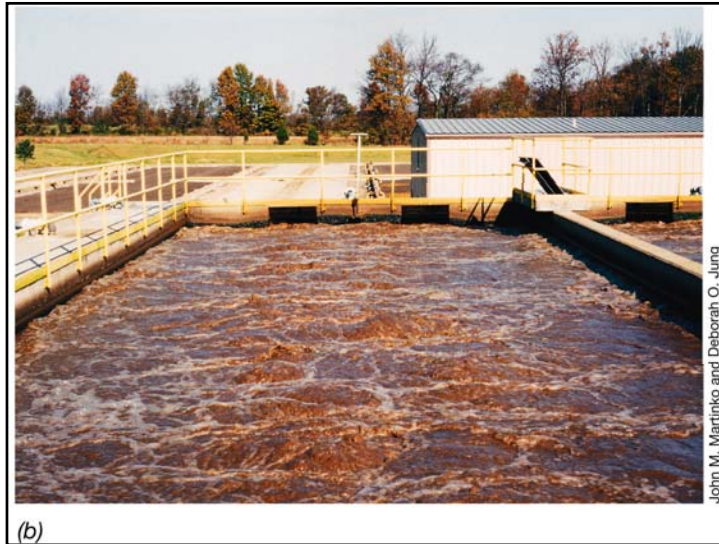


La forma dominante nei fanghi attivi è
Zooglea ramigera

Il liquame inoculato viene immesso nei serbatoi di aerazione dove vengono insufflate e fatte gorgogliare enormi quantità di aria

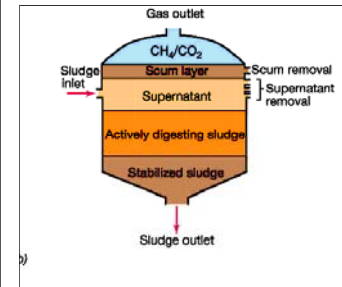


I microrganismi crescono velocemente e convertono (ossidando) le sostanze EBOM in minerali. Nel corso di questo procedimento la maggior parte dei patogeni muore



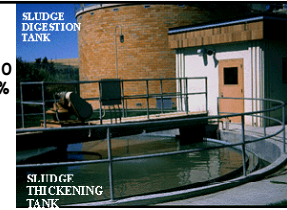
Nel corso della fase aerobia del trattamento (5-10 ore) il BOD della fase liquida si riduce del 75-90%

nella fase solida associata ai fiocchi la permanenza del liquame è breve e l'ossidazione scarsa



Il fango viene concentrato e spostato nel digestore anaerobio, dove si completa la digestione (diverse settimane) con produzione di metano

Il fango stabilizzato residuo è raccolto e avviato ai letti di essiccamento

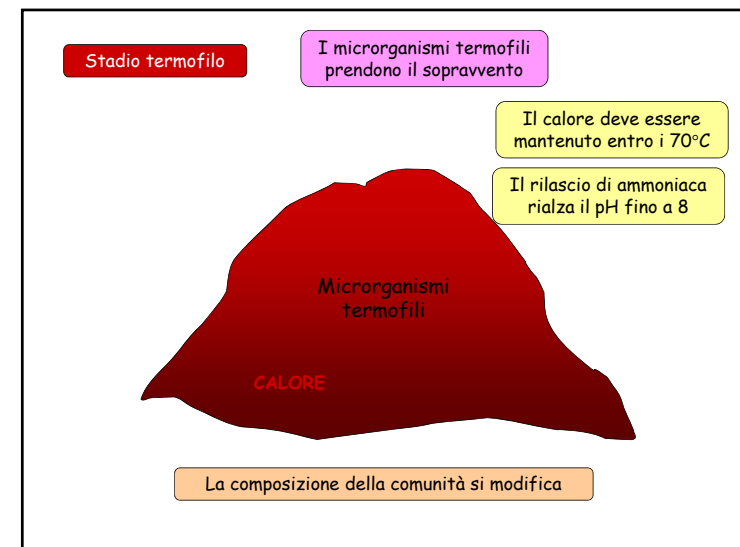
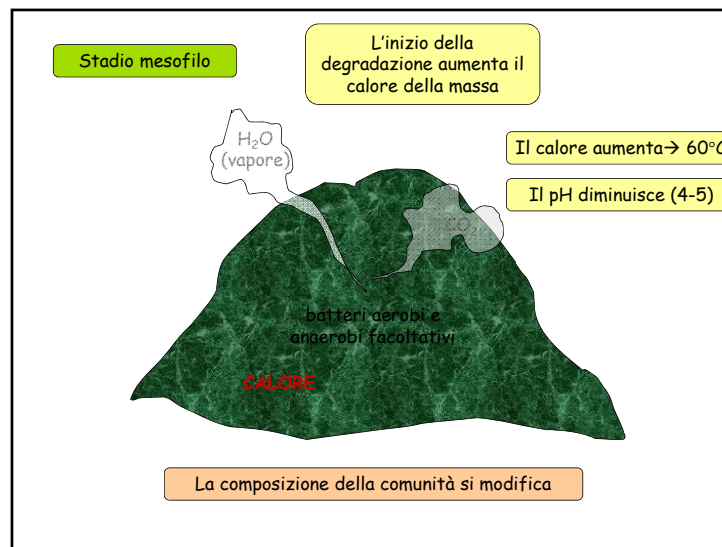
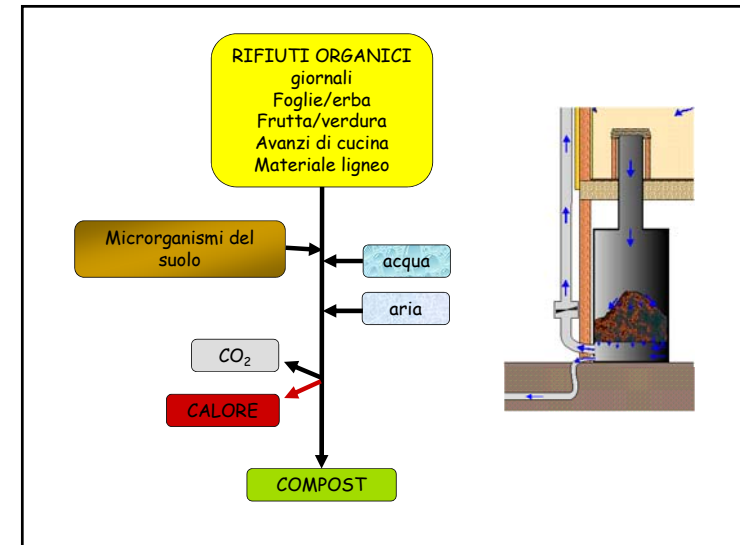


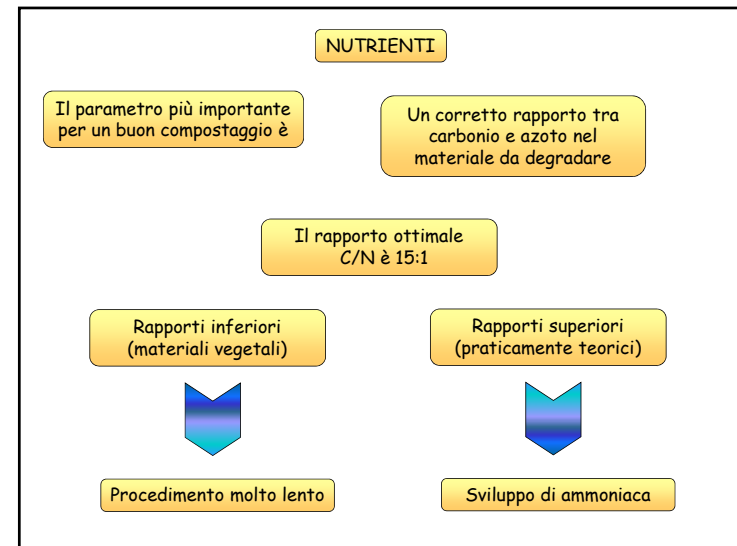
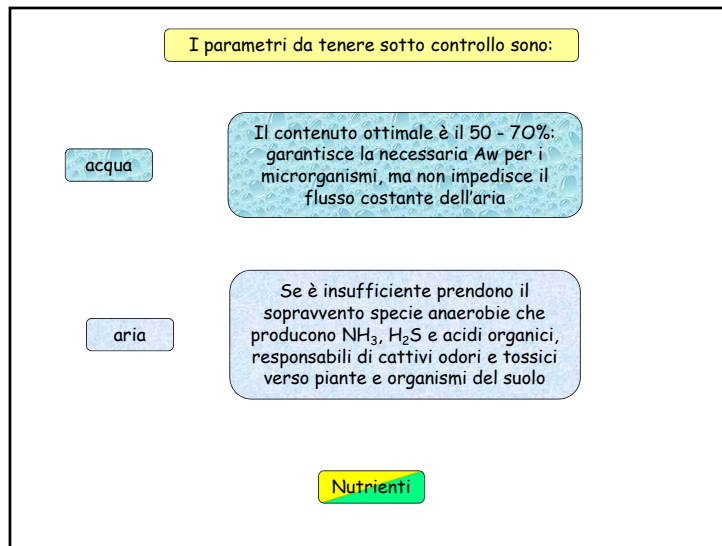
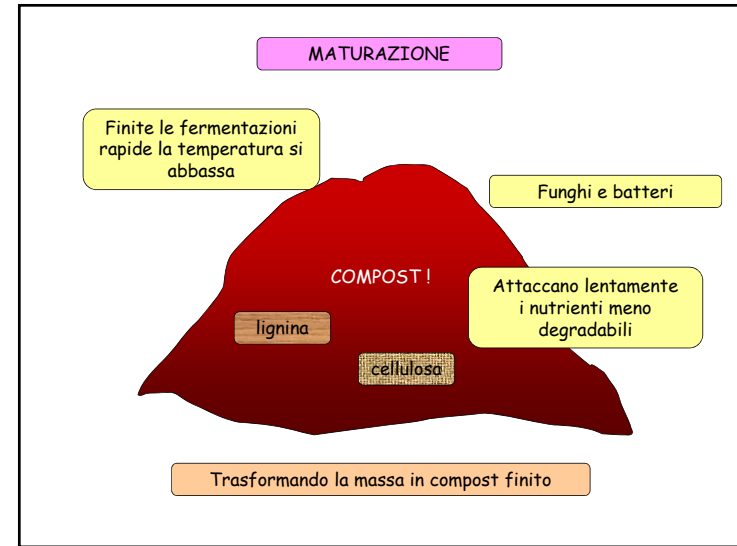
Da qui il fango stabilizzato può essere impiegato come fertilizzante, quando è sicuro (privo di sostanze tossiche, patogeni, radioattivi etc)



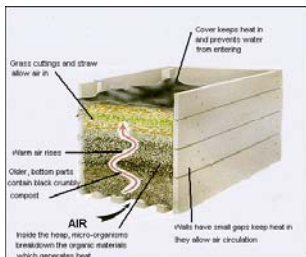
(a)

T.D. Brock





Gli impianti di compostaggio sono diffusi per il trattamento dei rifiuti organici nelle grandi utenze



Ma sono una pratica da incoraggiare anche per trasformare i rifiuti organici in paesi isolati e case sparse

La capacità microbica di produrre acidi e solubilizzare i metalli può essere utilizzata nelle procedure di

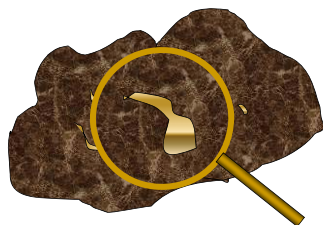


BIOLISCIVIAZIONE



Molti minerali grezzi contengono percentuali anche elevate di solfuri che formano composti insolubili con i minerali

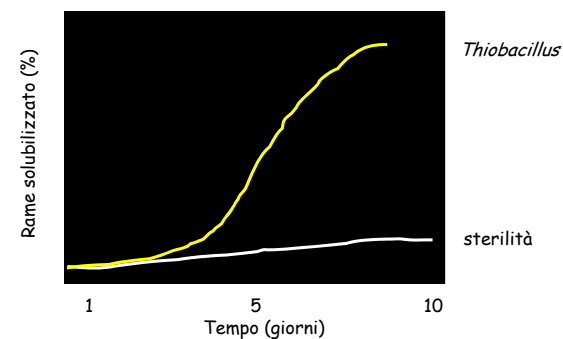
Quando la concentrazione del metallo è bassa l'estrazione chimica o per fusione sono antieconomiche



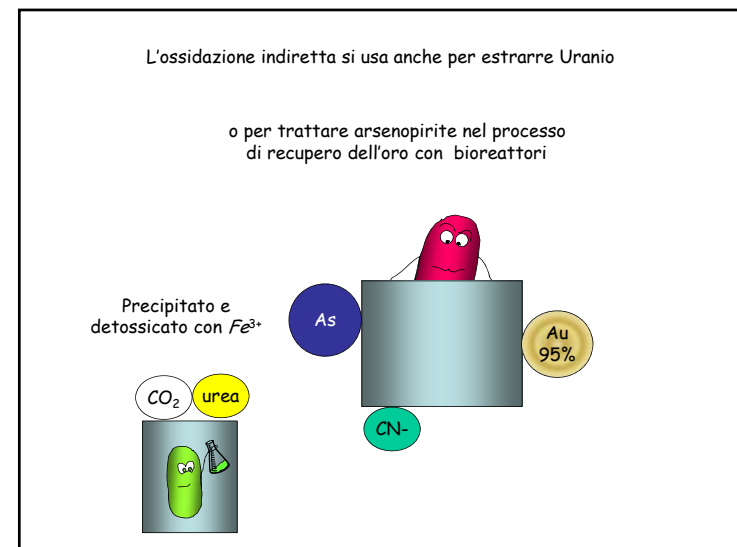
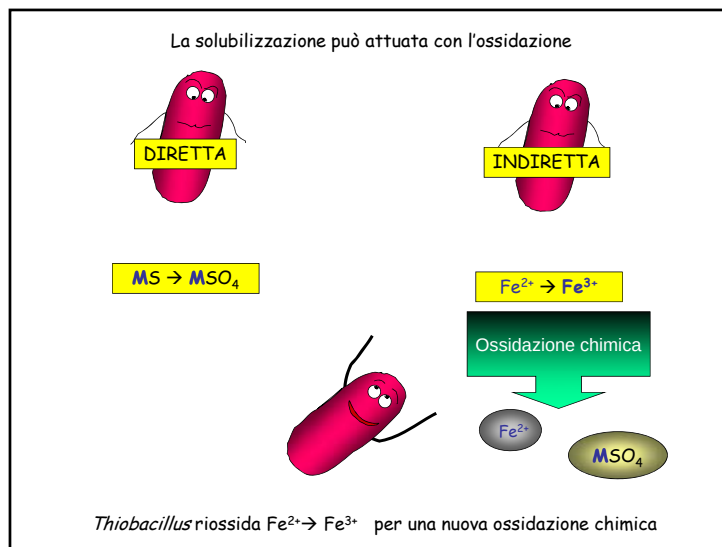
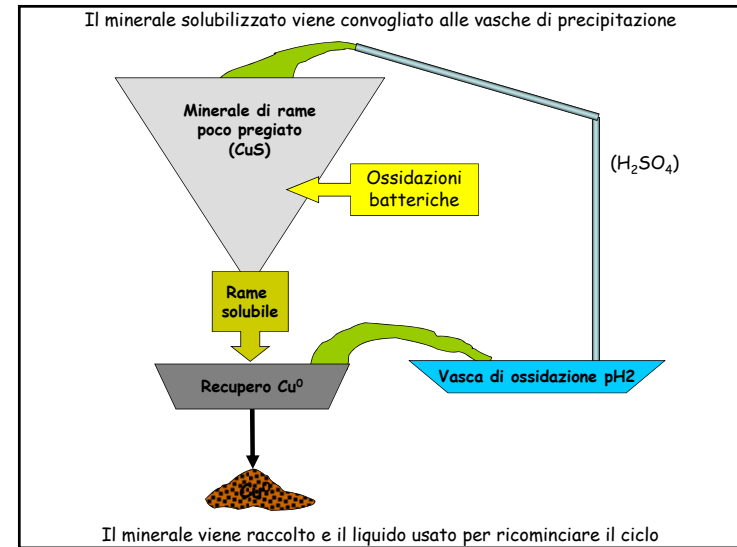
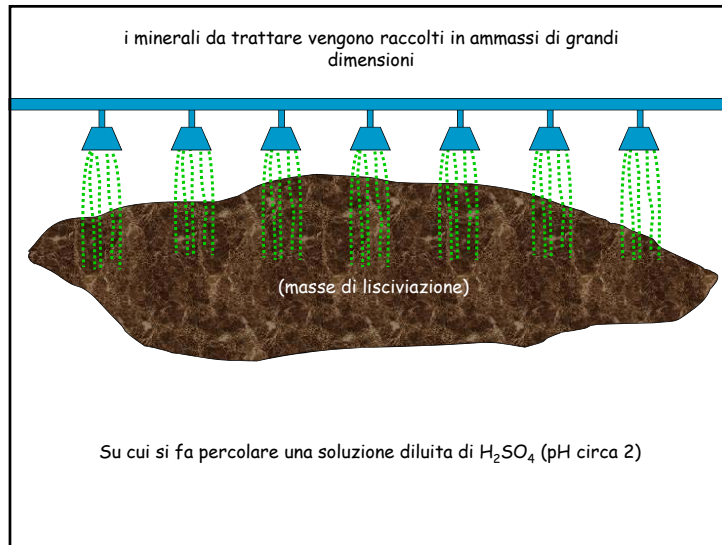
diventa conveniente usare la biolisciviazione microbica per portare in soluzione i minerali da miniere o da scarti minerali

batteri come *Thiobacillus ferrooxidans*

ossidano i solfuri con una velocità molto più elevata di quella che si potrebbe ottenere con l'ossidazione spontanea

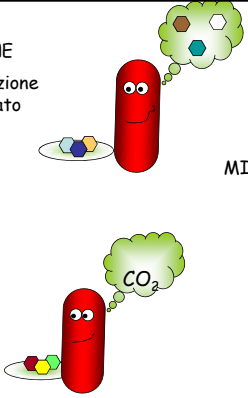


La biolisciviazione è impiegata per diversi minerali: i solfuri più suscettibili all'ossidazione microbica sono quelli di rame, Ferro, Uranio e Oro



BIODEGRADAZIONE
qualunque trasformazione operata sul substrato

MINERALIZZAZIONE

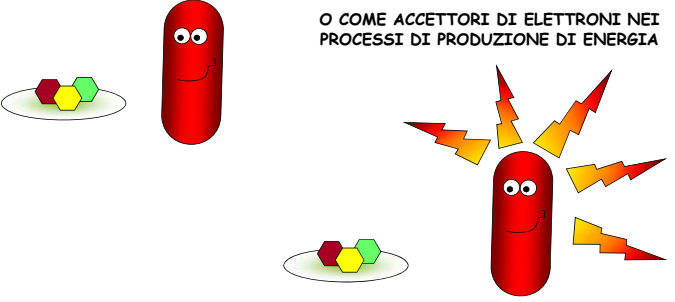


degradazione di una molecola organica fino ai componenti minerali (CO_2 , H_2O , NO_3^- etc): in genere effetto dell'azione di più specie microbiche

I MICRORGANISMI POSSONO AGIRE SUI COMPOSTI INQUINANTI

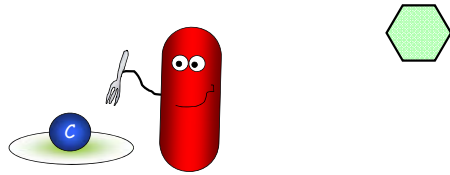
UTILIZZANDOLI COME FONTE DI NUTRIENTI (CARBONIO O AZOTO)

O COME ACCETTORI DI ELETTRONI NEI PROCESSI DI PRODUZIONE DI ENERGIA



DEGRADANDOLI NEL CORSO DELLA CRESCITA SU ALTRE FONTI (CO-METABOLISMO)

Enzimi utili per il processamento dei nutrienti riconoscono come substrato anche il composto inquinante

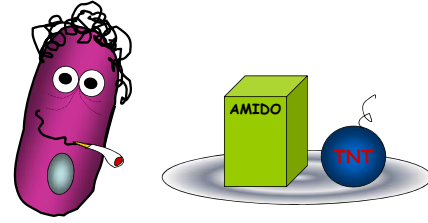


Per questo motivo è importante che sia presente una fonte di carbonio efficiente, per ottenere una buona produzione degli enzimi necessari

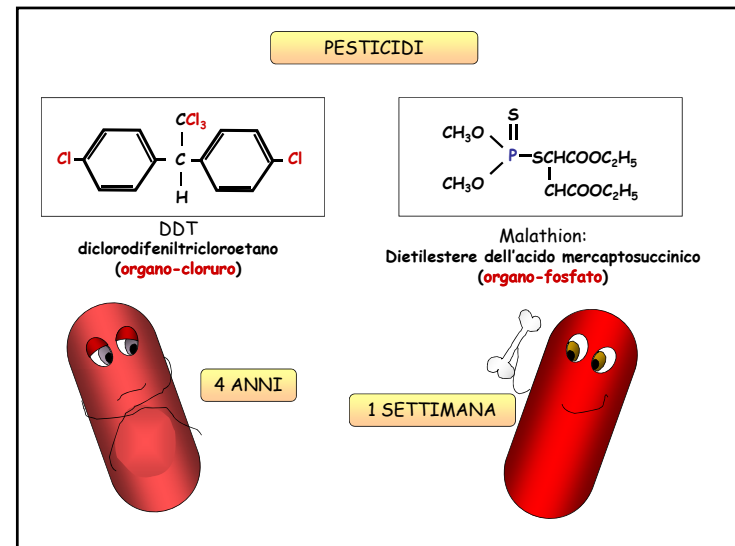
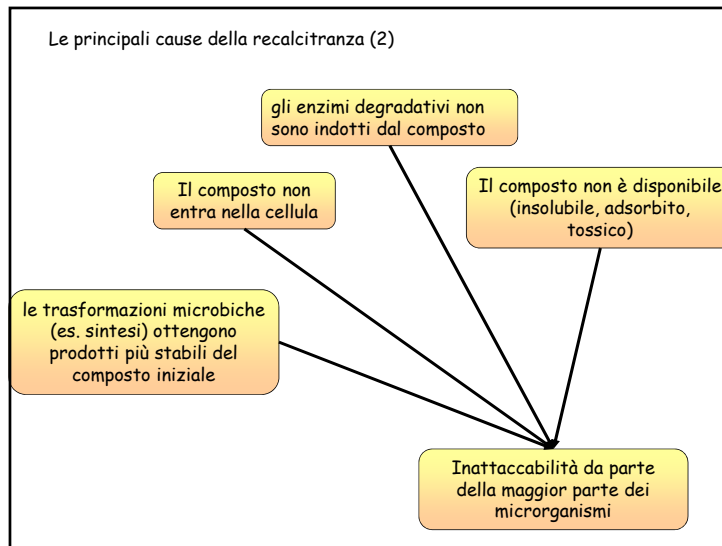
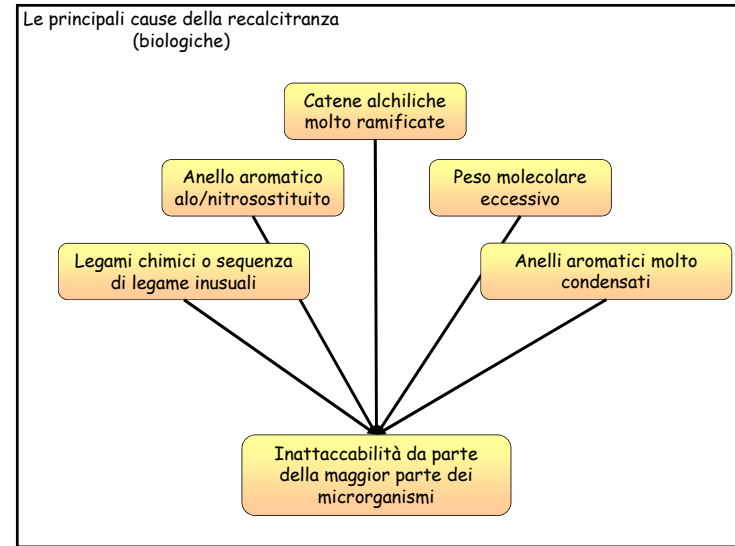
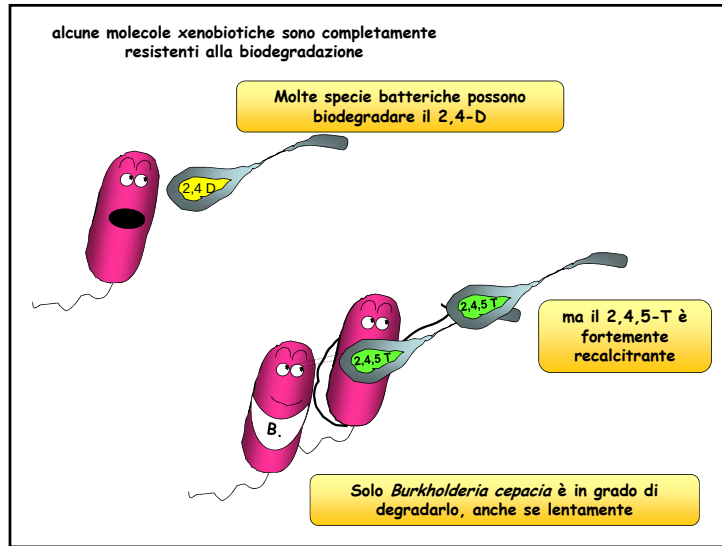
Degradazione del TriNitroToluene (cometabolismo)

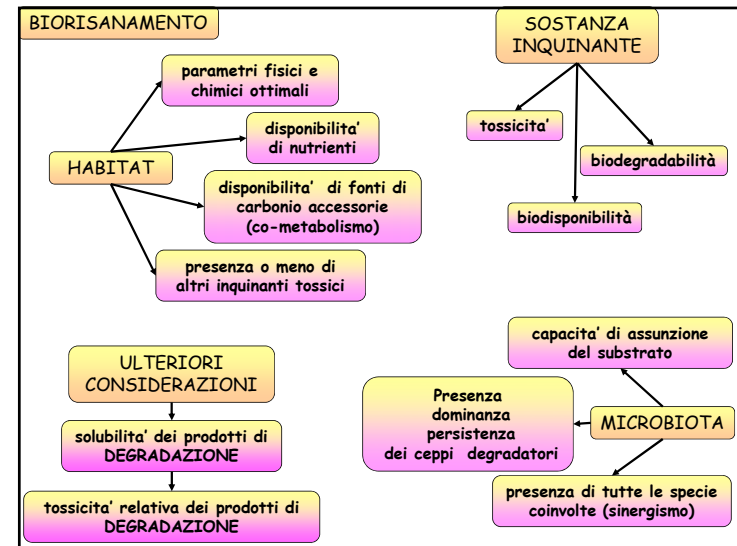
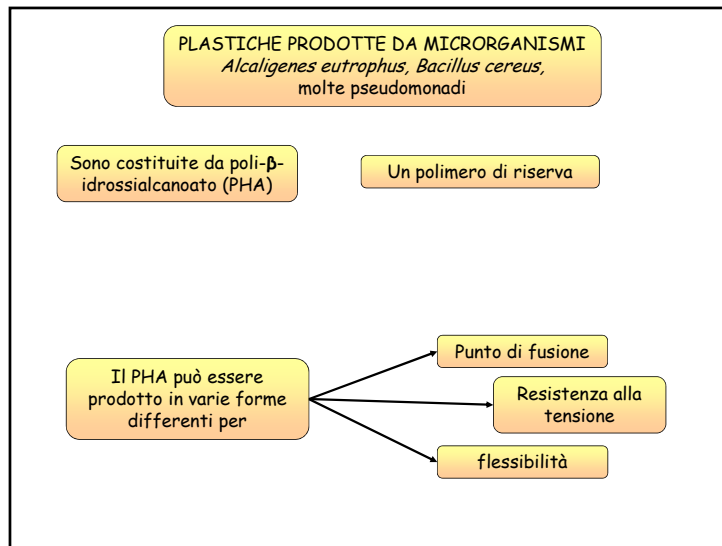
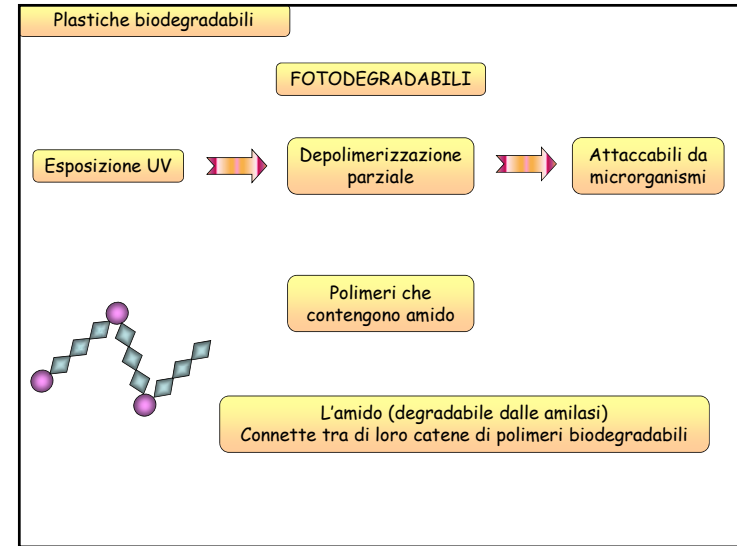
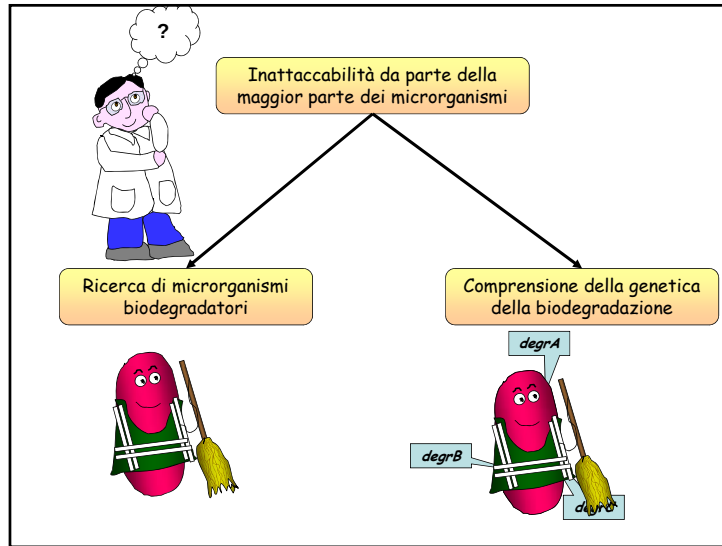
Nei pressi dei depositi di munizioni la percentuale di TNT nel suolo può arrivare al 5%

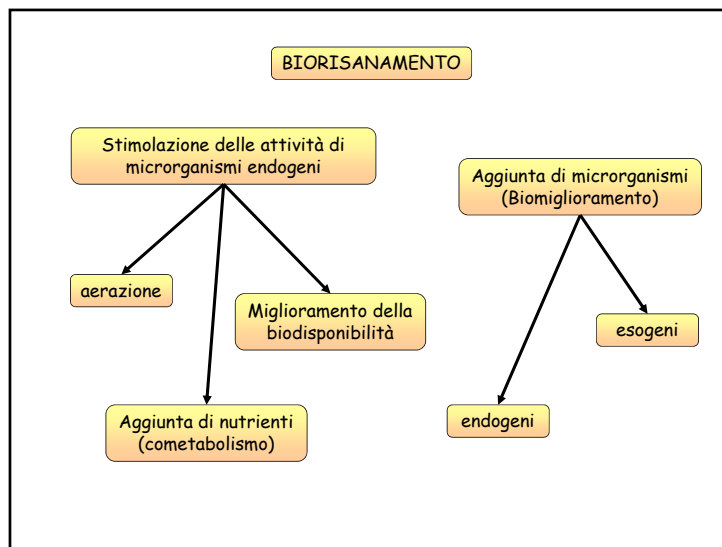
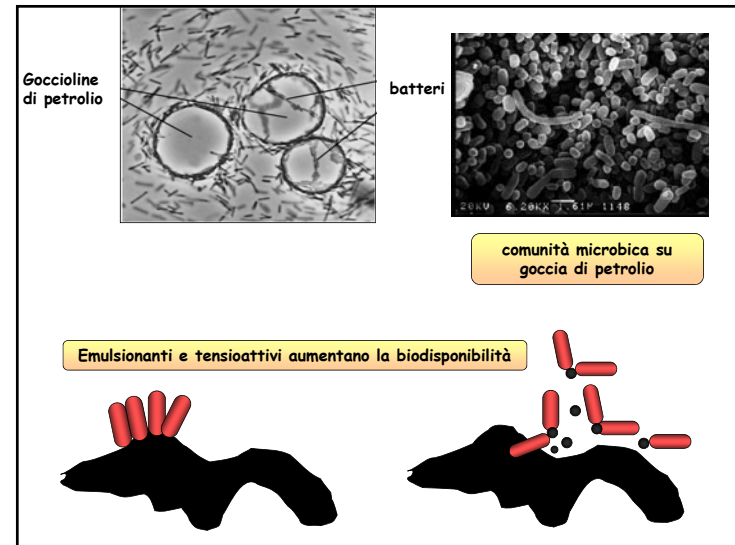
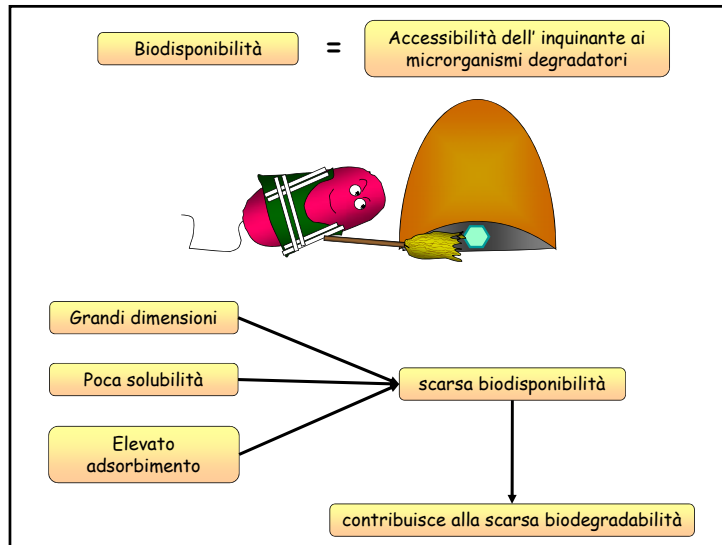
Clostridium bifermentans può degradarlo velocemente in presenza di amido

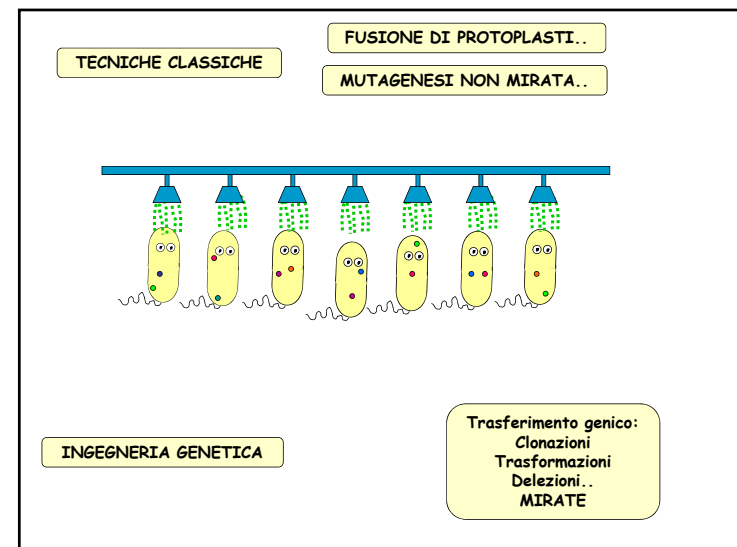
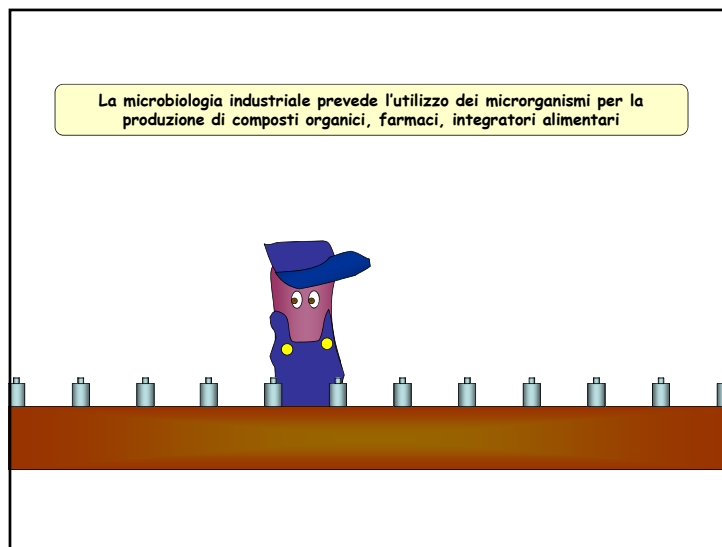
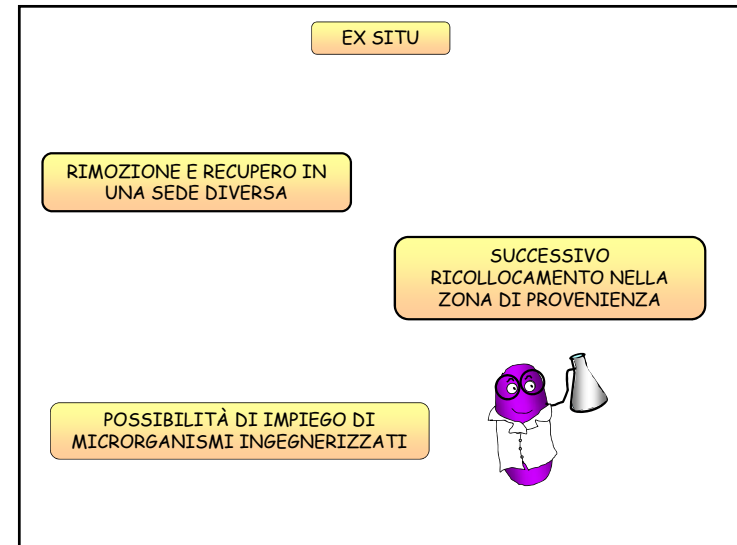
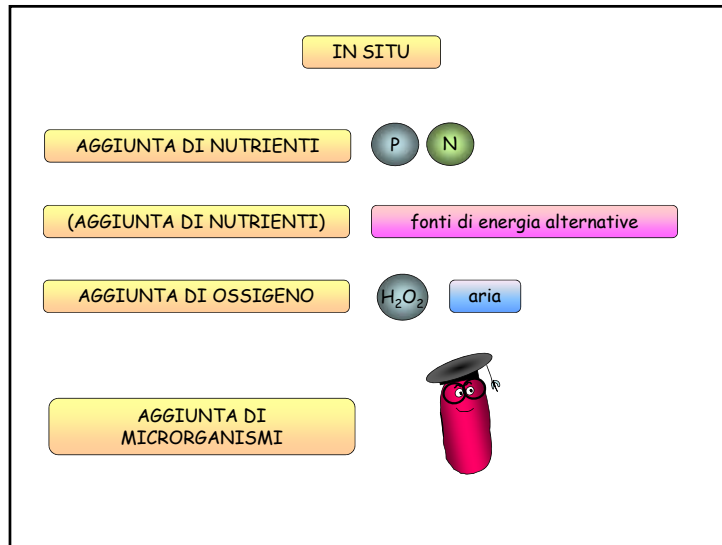


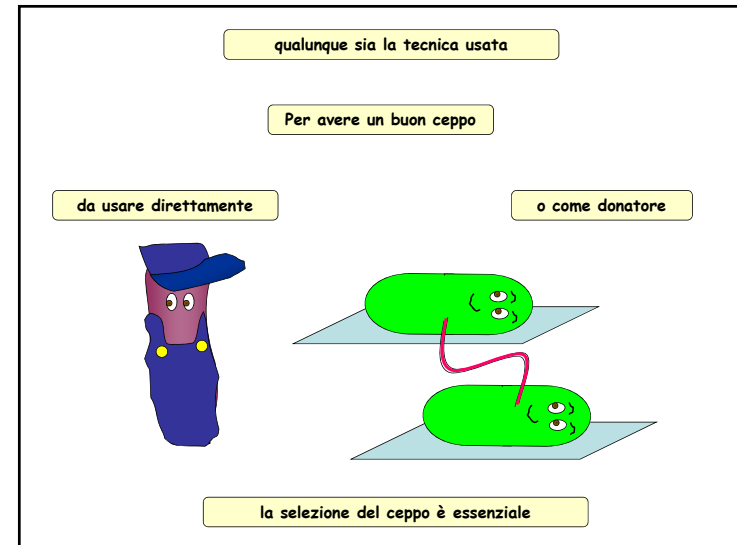
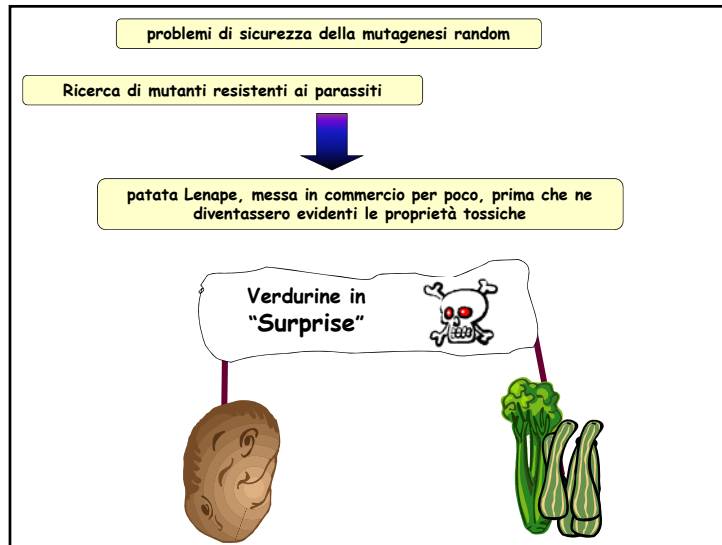
non usa TNT come fonte di energia ma lo degrada se è disponibile amido come fonte di carbonio

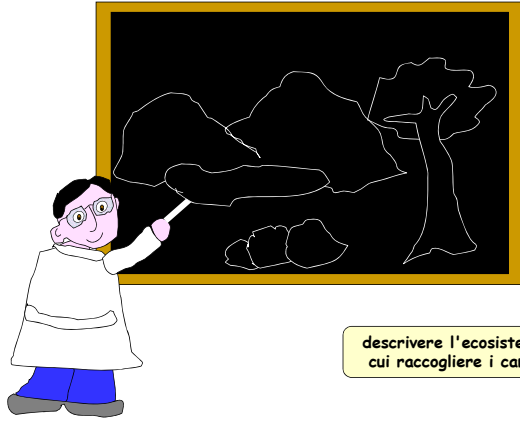












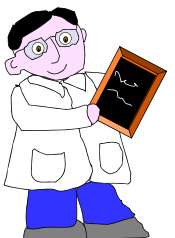
descrivere l'ecosistema da cui raccogliere i campioni

raggruppare i campioni per tipi:

Foglie	Radici	Sassi	Terriccio	Sedimento
				
				
				
				
				



ELENCARE :



i parametri ambientali da considerare e misurare (salinità, pH, potenziale redox, temperatura)

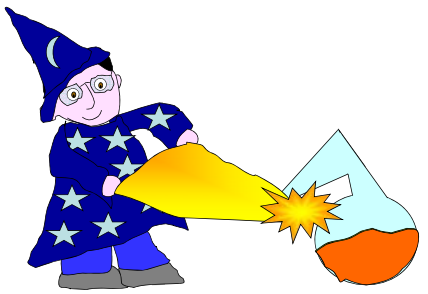
i substrati naturali disponibili nell'ecosistema (es: chitina nel suolo delle foreste..)

sulla base di queste considerazioni:
decidere le tecniche di isolamento da impiegare



e valutarle confrontandole con metodi standard

Eventualmente modificare tecniche note per adattarle al materiale da esaminare

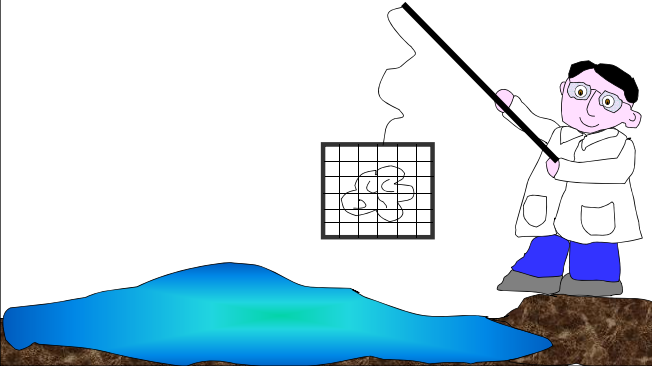


impiegare procedure di arricchimento specifico per i gruppi microbici che si cercano

UN ARRICCHIMENTO PARTICOLARE

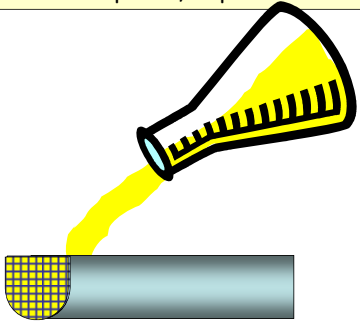
La tecnica del "baiting" (attrazione), colloca nell'ambiente substrati specifici, per attrarre e "catturare" i microrganismi desiderati

Es: per isolare microrganismi cheratinolitici, si possono usare reticelle metalliche riempite di lana immergendole nell'acqua



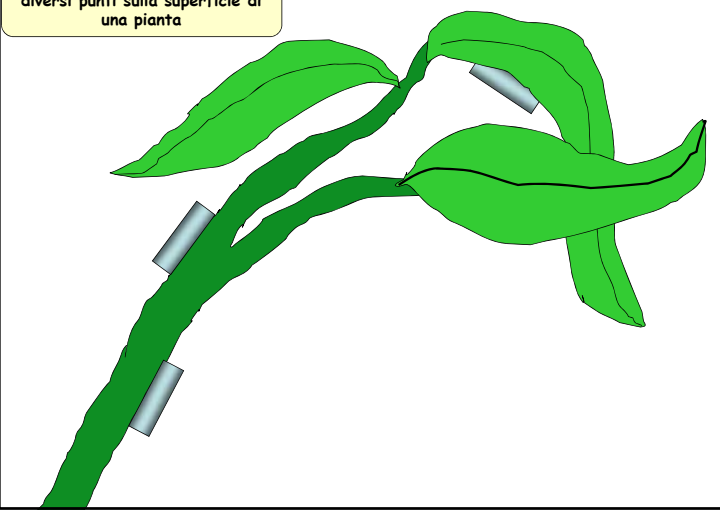
Trappole per attinomiceti

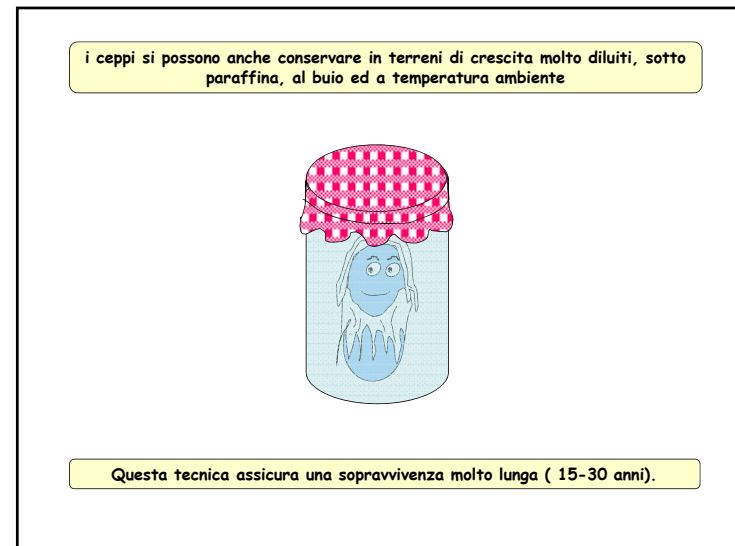
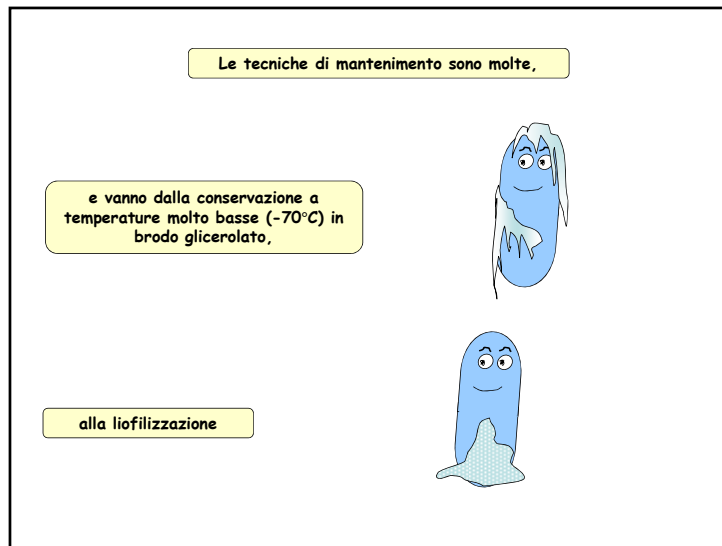
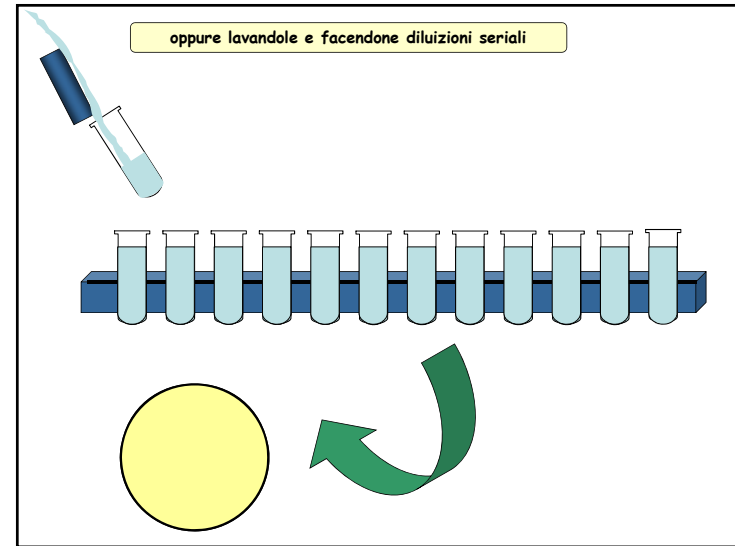
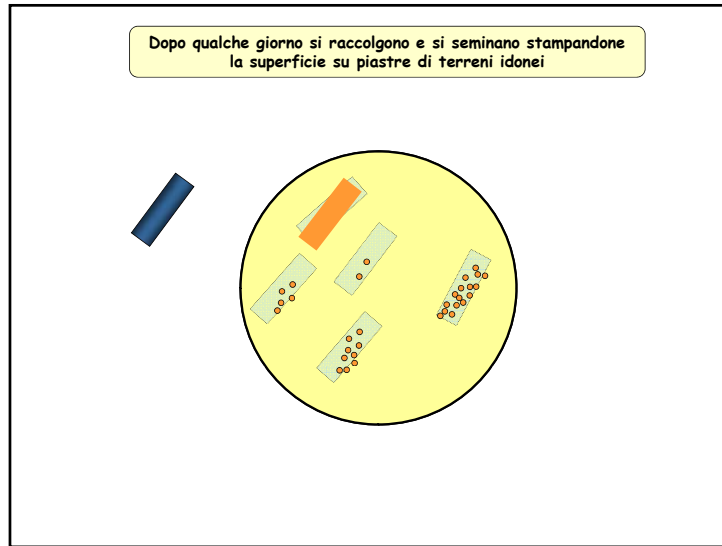
Una doccia di vetro viene chiusa alle estremità con un filtro sufficiente ad evitare l'ingresso di larve e protozoi, ma permeabile ai batteri (100 μ m),

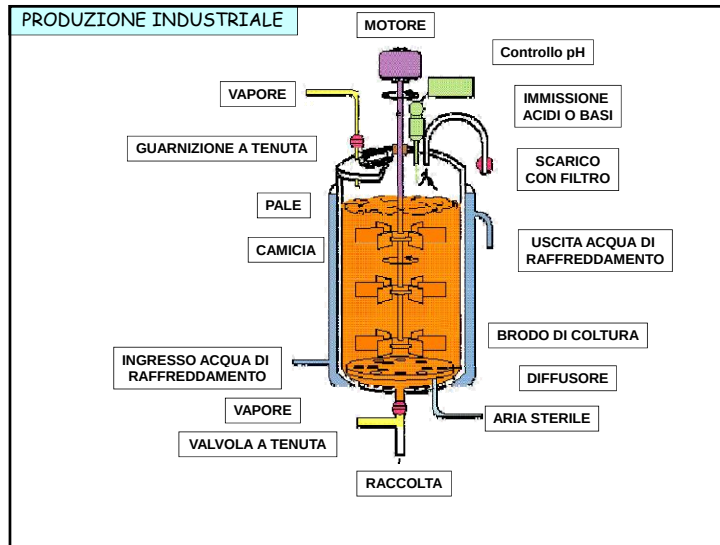


Un terreno adatto alla crescita di attinomiceti viene colato nella doccia e lasciato solidificare

Le docce vengono applicate in diversi punti sulla superficie di una pianta







I più comuni sono quelli ad agitazione, in cui la massa è costantemente agitata da ventole che girano intorno ad un asse



da piccole unità per uso di laboratorio (5-10 litri) si arriva a fermentatori che possono contenere anche 500.000 litri di terreno

CAPACITÀ IN LITRI :	PRODUZIONE DI :
1-20.000	enzimi diagnostici o reagenti per biologia molecolare
40.000-80.000	antibiotici, alcuni enzimi
100.000-150.000	vino, birra, aminoacidi, proteasi, amilasi, penicillina, antibiotici aminoglicosidici, trasformazioni di steroidi
200.000-500.000	acido glutammico; vino; birra

Dimensioni così imponenti pongono problemi di gestione:



STERILIZZAZIONE DEL TERRENO

IN BATCH

CONTINUA

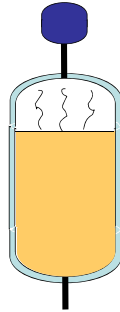
AERAZIONE ED AGITAZIONE

QUALITÀ DEI NUTRIENTI

DIFFUSIONE DEL CALORE E CONTROLLO DELLA TEMPERATURA

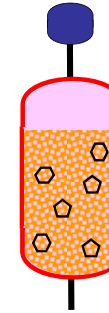
STERILIZZAZIONE IN BATCH

Il terreno è immesso nel fermentatore dove viene portato e mantenuto alla temperatura di sterilizzazione



poi raffreddato fino alla temperatura ottimale per la fermentazione (l'intero tank viene usato come una gigantesca autoclave)

La sterilizzazione in batch è pratica ma può danneggiare eventuali componenti termolabili del terreno (in genere fattori di accrescimento indispensabili per alcuni microrganismi)



Se esiste un problema di questo tipo si presta meglio la tecnica di sterilizzazione "CONTINUA"

STERILIZZAZIONE CONTINUA

Il terreno fluisce attraverso una condotta e viene riscaldato rapidamente attraverso scambio di calore o iniezione di vapore

Il tempo di sterilizzazione è determinato dalla velocità del flusso e dalla lunghezza della condotta



il raffreddamento si ottiene per scambio, o con una camera di espansione: parte dell'acqua evapora istantaneamente con perdita di calore

Con questa tecnica si può aumentare il volume del terreno senza modificare il tempo e la temperatura di sterilizzazione, perché i tempi di riscaldamento e di raffreddamento sono virtualmente assenti

se la sostanza termolabile e la sua costante di inattivazione sono note, si può usare una relazione matematica per stabilire le condizioni ottimali

$$L = \ln(C_0/C) = Kt$$

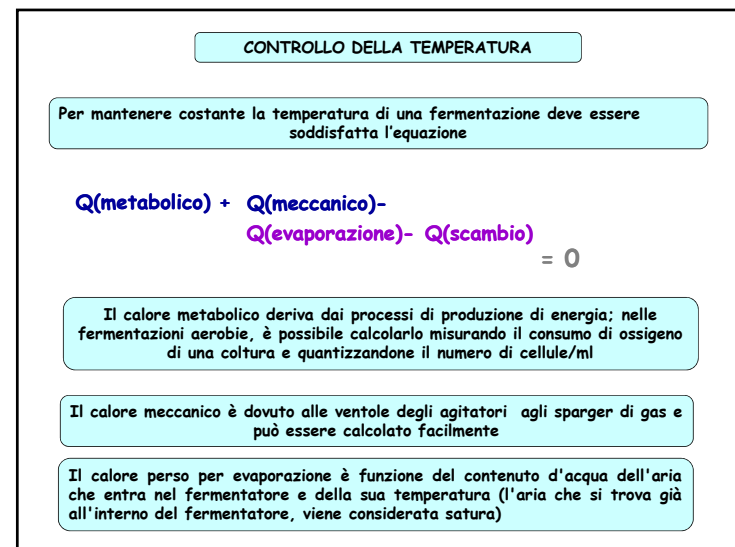
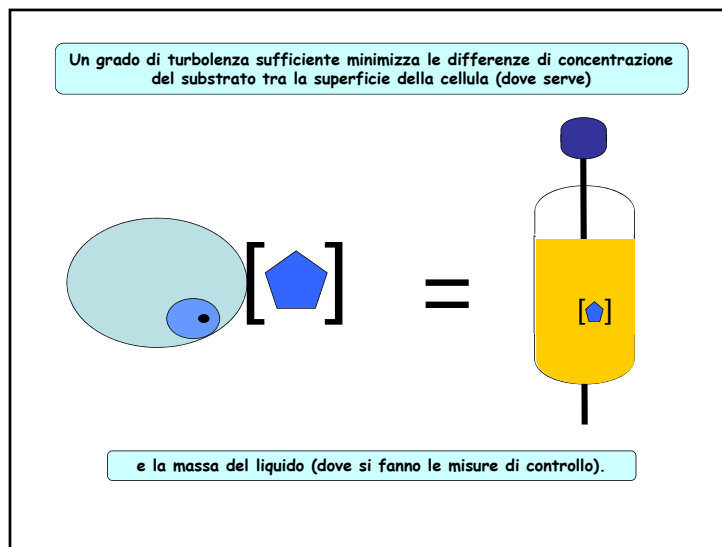
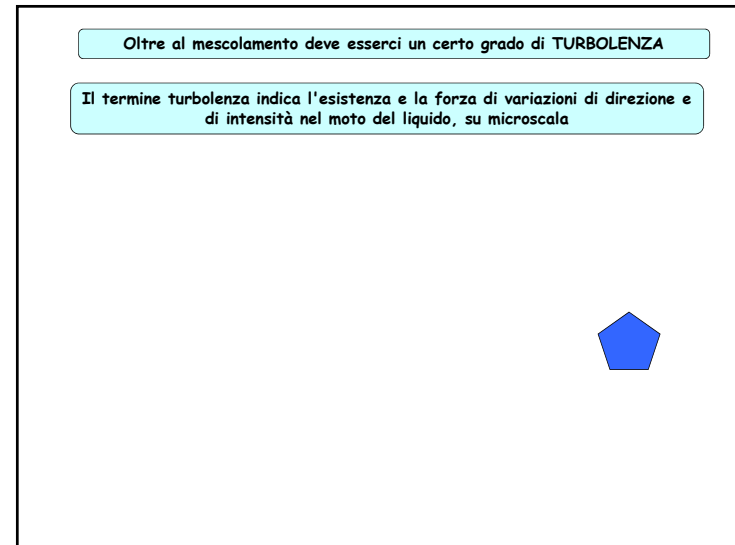
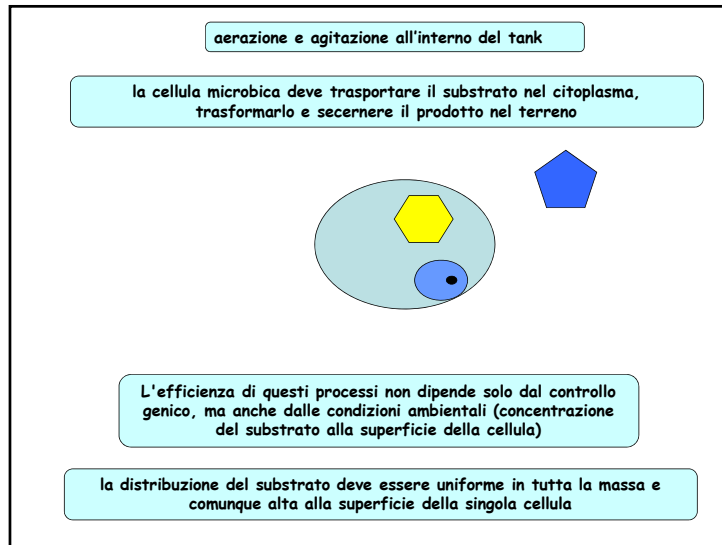
L : criterio di qualità del nutriente

C_0/C : rapporto tra concentrazione iniziale e finale

K: costante di inattivazione termica della sostanza considerata
T: tempo

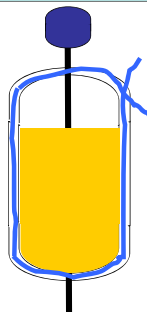
A volta tuttavia non sono note la natura della sostanza termolabile o le sue caratteristiche o la sua concentrazione

E i parametri vanno stabiliti empiricamente



PER SODDISFARE L'EQUILIBRIO TERMICO

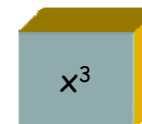
bisogna sottrarre calore attraverso le superfici di scambio, che vengono poste a contatto con acqua di refrigerazione



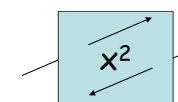
Questa necessità pone un limite alle dimensioni possibili per un fermentatore, che non possono superare quelle in cui il calore sviluppato è quello che è possibile sottrarre si equivalgono

La possibilità di variare la temperatura dipende dalla grandezza del fermentatore

lo sviluppo di calore in un fermentatore aumenta con il cubo delle dimensioni lineari (volume della massa)



Il calore è scambiato attraverso le pareti: la superficie disponibile allo scambio aumenta con il quadrato della dimensione lineare



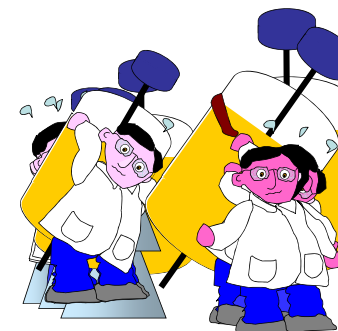
il rapporto tra superficie e volume (la possibilità di scambiare calore) diminuisce con l'aumentare delle dimensioni lineari del fermentatore

Il processo con il quale si giunge dalle colture di laboratorio alla fase di produzione, viene definito scaling up delle colture

Lo Scaling-up deve tener conto di tutti gli aspetti descritti, per arrivare alle condizioni ottimali per la produzione

Il procedimento avviene attraverso diversi stadi, il numero e le condizioni dei quali sono tra le cose da stabilire volta per volta

Normalmente si provano diversi gradi, aumentando le dimensioni del fermentatore a poco a poco, prima in laboratorio, poi (uno o due stadi) in impianti pilota, prima di passare alla produzione



Il passaggio attraverso molti stadi è dettato da considerazioni pratiche (è più economico che rischiare di costruire un impianto su basi insufficienti)

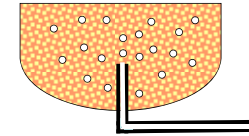
Gli impianti pilota in genere sono pochi e l'ultimo deve avere le maggiori dimensioni possibili, per servire come modello per i fermentatori della fase di produzione, ancora più grandi



Questo è particolarmente importante con i miceti che danno origine a liquidi viscosi, per poter fare una stima accurata dei possibili problemi di mescolamento

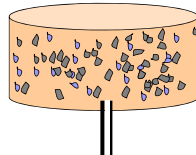
Esistono altri tipi di fermentatori, che rispondono a problemi particolari

A INSUFFLAZIONE D'ARIA: il rimescolamento è garantito da bolle d'aria introdotte dal fondo

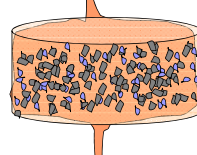


Questi fermentatori eliminano i problemi correlati con l'agitazione durante le fermentazioni sostenute da miceti filamentosi

Fermentatori in cui i microrganismi sono adesi a particelle di supporto

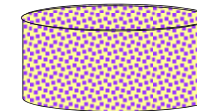


Le particelle possono essere mantenute in sospensione da una corrente ascendente di liquido o gas

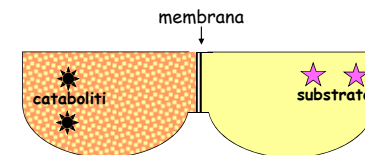


o essere fisse e bagnate dal terreno, introdotto con flusso discendente o ascendente

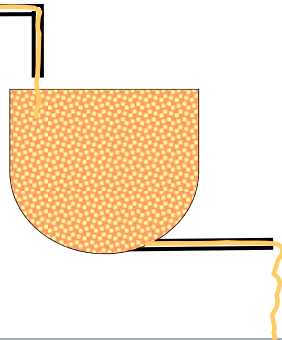
Esistono anche reattori in cui le fermentazioni si svolgono su strato solido (senza acqua libera)



oppure unità di dialisi, in cui il flusso del substrato e l'allontanamento dei prodotti tossici vengono garantiti per osmosi



Le unità per la crescita continua non sono molto usate per via della difficoltà di controllare il sistema e della possibilità di comparsa di mutanti indesiderati, in grado di competere con il ceppo iperproduttore



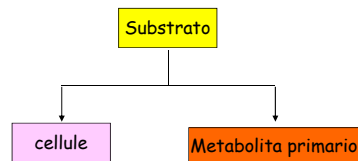
Un problema di questo tipo è sorto, ad esempio, nel corso di produzioni di antibiotici effettuate per mezzo di ceppi industriali ingegnerizzati

Gli esperimenti più recenti per cercare di migliorare la resa delle fermentazioni sono quelli effettuati nello spazio



In assenza di gravità le cellule rimangono più finemente disperse ed hanno un accesso migliore ai nutrienti rispetto a quanto accade sulla Terra

I prodotti microbici da ottenere vengono spesso classificati in metaboliti primari (aminoacidi, nucleotidi e prodotti finali della fermentazione come etanolo o acidi organici, eso o endo-enzimi)



che vengono prodotti durante la prima fase della crescita e sono in relazione con la sintesi dei componenti della cellula microbica

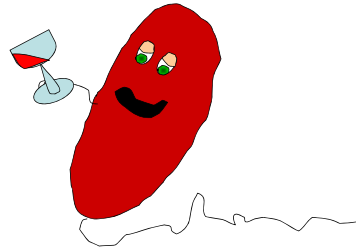
e metaboliti secondari (antibiotici, micotossine) che si accumulano nella fase stazionaria (IDIOFASE) e non fanno parte dei normali costituenti cellulari



La maggior parte dei metaboliti importanti dal punto di vista industriale fa parte di questi ultimi

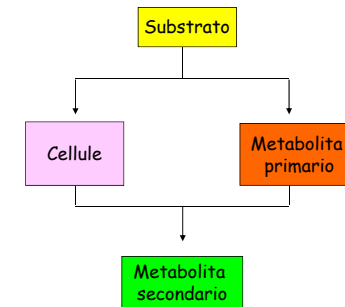
nel microrganismo la sintesi dei prodotti secondari è strettamente regolata

per avere una buona resa, bisogna evitare condizioni ambientali che possano innescare un meccanismo di repressione



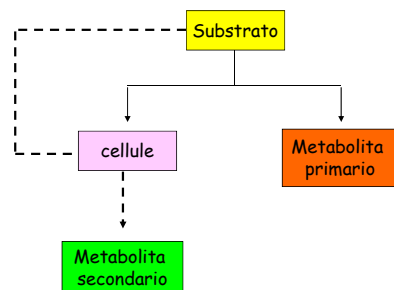
Ma nella maggior parte dei casi, è necessario ottenere
MUTANTI DEREGOLATI

Il metabolita secondario può essere ottenuto dalla fermentazione senza ulteriori interventi



(dopo che le cellule sono cresciute ed hanno prodotto un Metabolita primario, proseguono convertendolo nel secondario)

Oppure aggiungendo nuovo substrato da convertire in metaboliti secondari

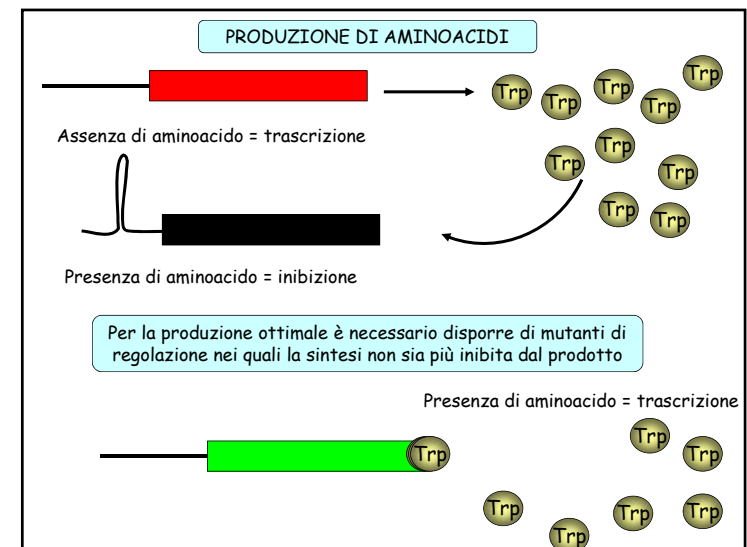
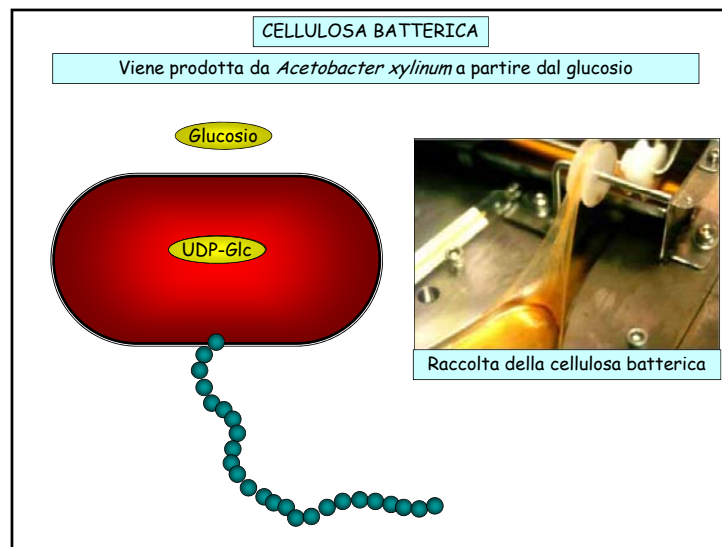
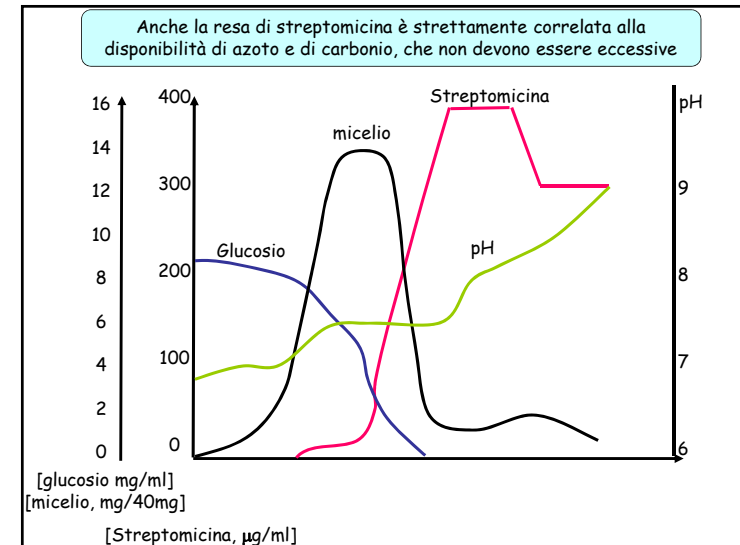
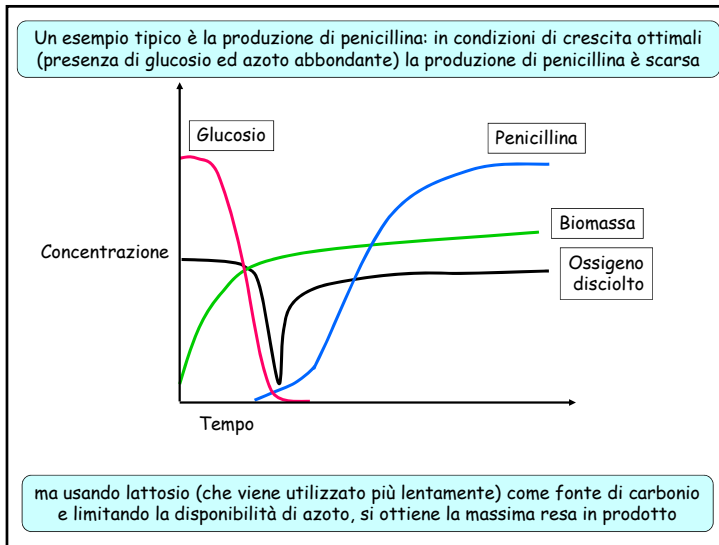


dopo che le cellule sono cresciute ed hanno prodotto Metaboliti primari

Per ottenere il prodotto desiderato è necessario studiare attentamente le condizioni in cui si fanno crescere i microrganismi:



condizioni che favoriscono una crescita rapida con formazione di abbondante biomassa possono essere non ottimali per la produzione



Questi mutanti sono spesso ottenuti da *Corynebacterium glutamicum*



in cui bassi livelli di biotina e la presenza di derivati di acidi grassi provocano un'accentuata permeabilità di membrana (e l'escrezione degli aminoacidi prodotti)

PRODUZIONE DI LISINA

Mutanti "AEC" di *Brevibacterium flavus*

Esprimono una aspartochinasi modificata insensibile al legame con

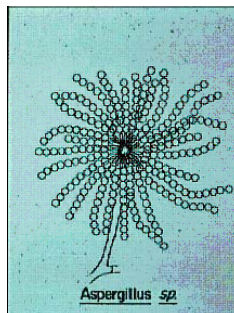
LISINA

AMINO-ETIL-CISTEINA
(analogo della lisina)

che legano l'asparto-chinasi wild, bloccandola

ACIDI ORGANICI

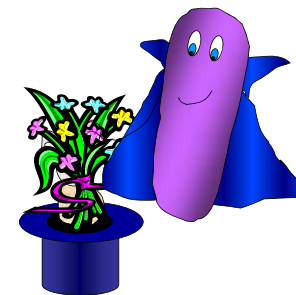
si ottengono da *Aspergillus* controllando molto strettamente la disponibilità dei metalli in tracce come manganese e ferro



i terreni vengono preparati trattandoli con resine a scambio ionico

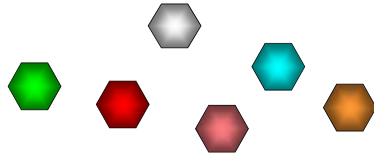
BIOCONVERSIONI

Un particolare tipo di produzione è la bioconversione

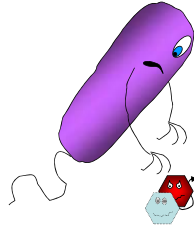


In questo caso ai microrganismi si chiede di trasformare un substrato in un altro prodotto

Quasi tutti i composti organici possono essere oggetto di bioconversione

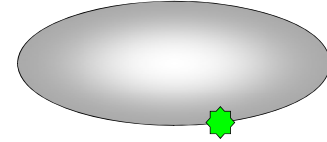


Le sole eccezioni sono i composti instabili o molto reattivi



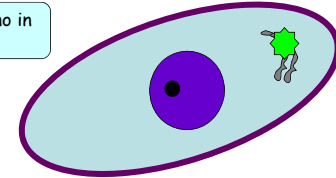
Gli enzimi possono trovarsi all'interno o all'esterno della cellula

nei batteri ci sono enzimi solubili
(estraibili con diversi metodi)
nel citoplasma o nel periplasma



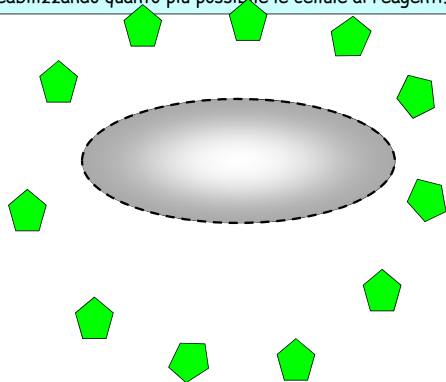
e enzimi particolati legati alle membrane

Nei funghi e nei lieviti gli enzimi sono in
genere associati con gli organelli



Se la localizzazione precisa di un enzima utile non è nota è necessario definire
protocolli sperimentali per stabilire le condizioni ottimali

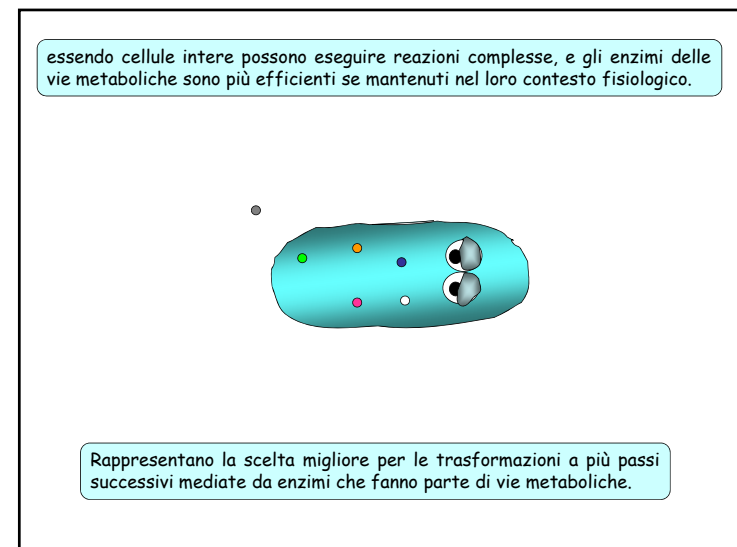
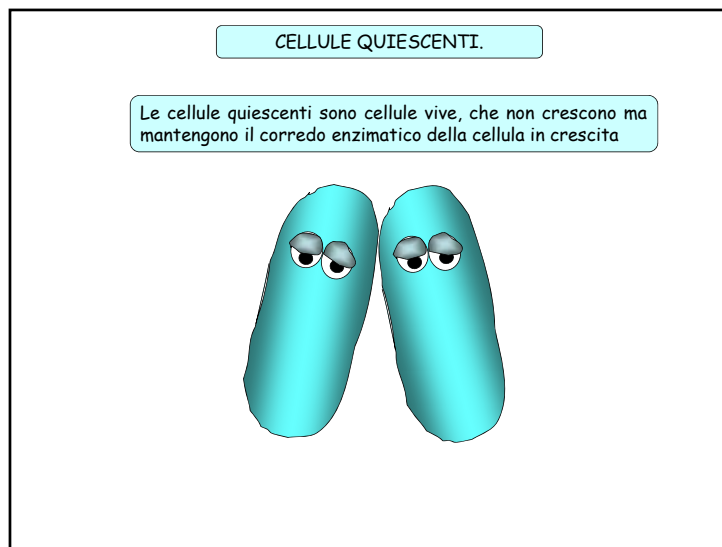
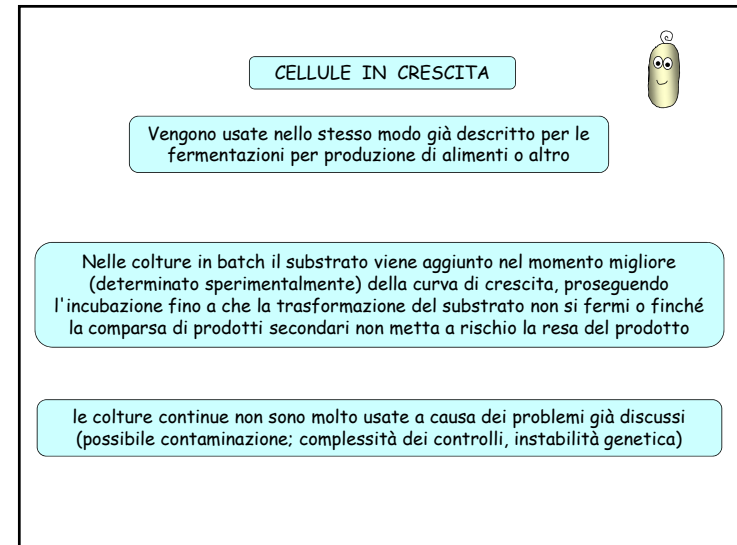
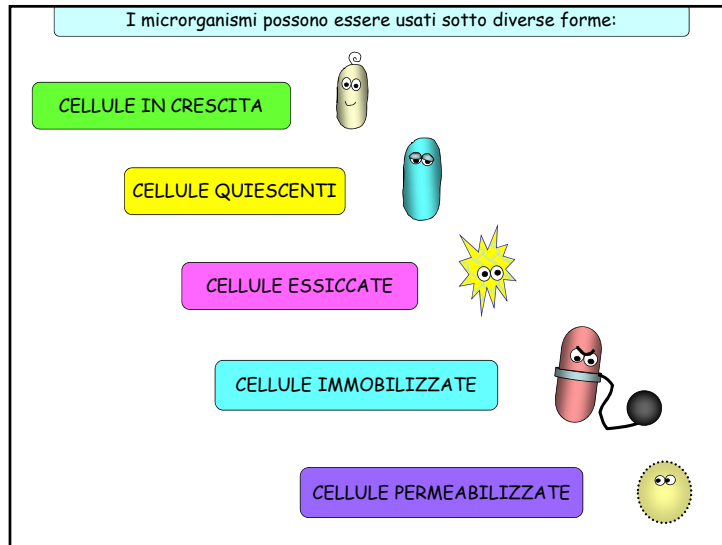
favorendo al massimo la dispersione e la solubilizzazione del substrato, e
permeabilizzando quanto più possibile le cellule ai reagenti.



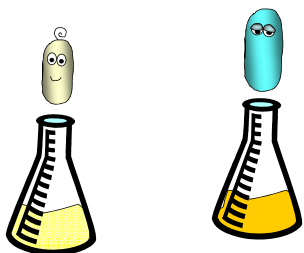
Gli enzimi da usare possono essere costitutivi
(caso più frequente nei funghi o nei lieviti)

o indotti dalla presenza di diversi composti
organici (caso più frequente nei batteri)

Spesso, quando c'è un'induzione, vengono attivate vie multienzimatiche;
variando oculatamente le condizioni di crescita è possibile usare questi
enzimi da soli o in cooperazione tra loro per catalizzare reazioni utili

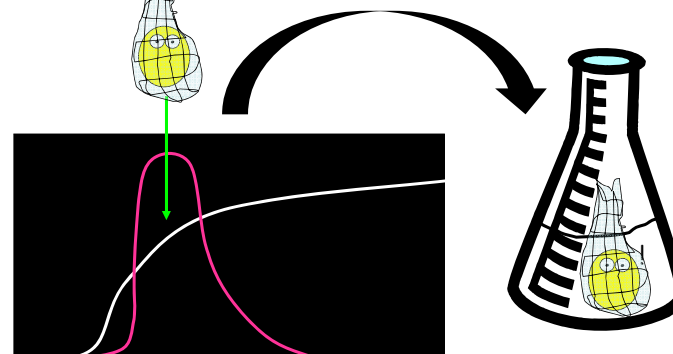


E si possono usare a densità irraggiungibili per le colture in crescita riducendo significativamente i tempi del processo



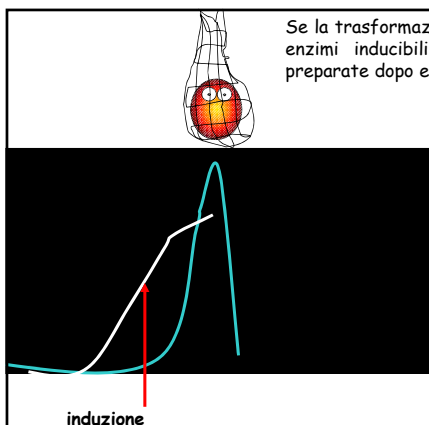
Se si assicurano livelli di O_2 ottimali nel corso della trasformazione, (O_2 non serve per la crescita ma per la vitalità e la bioconversione)

Le CQ si ottengono allontanandole dal terreno di coltura nel momento in cui la produzione dell'enzima responsabile della bioconversione è massima



e sospendendole in tamponi, in terreni di coltura privi di un nutriente limitante, in acqua distillata o in miscele di solventi non acquosi.

Se la trasformazione è dovuta ad uno o più enzimi inducibili, le CQ devono essere preparate dopo essere state indotte

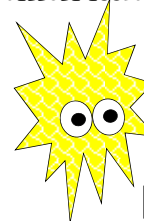


Un esempio di impiego di C.Q. è quello della trasformazione di steroli da parte di *Nocardia*, o *Septomyxa*

O delle riduzioni specifiche di chetoni svolte dai lieviti (es. sintesi asimmetrica di L-carnitina)

Nel caso della trasformazione degli steroidi, il rapporto di efficienza tra CQ e cellule in coltura è di 12:1

CELLULE ESSICcate



Se gli enzimi responsabili della trasformazione resistono al trattamento necessario, è possibile usare cellule essiccate che si aggiungono sotto forma di polveri alle reazioni

Alcuni degli enzimi che resistono al trattamento sono:

Esterasi

Amidasi

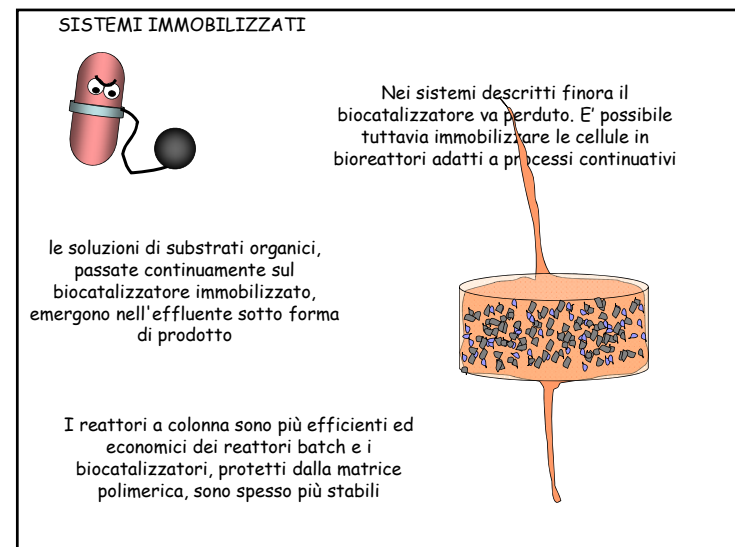
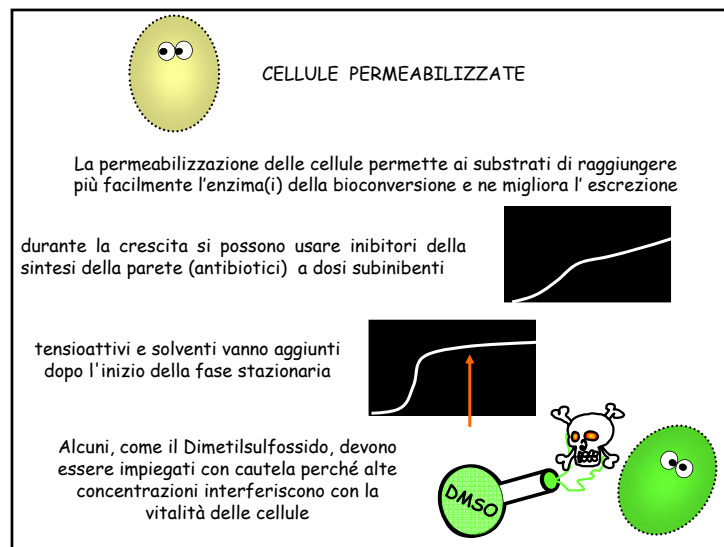
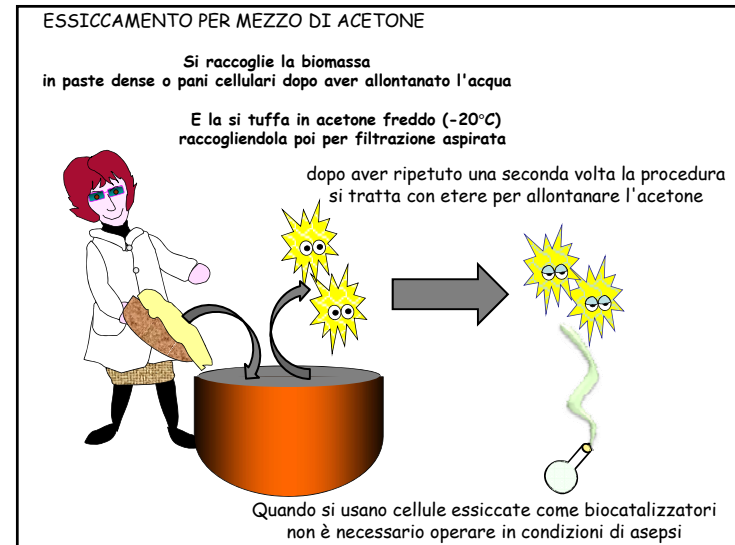
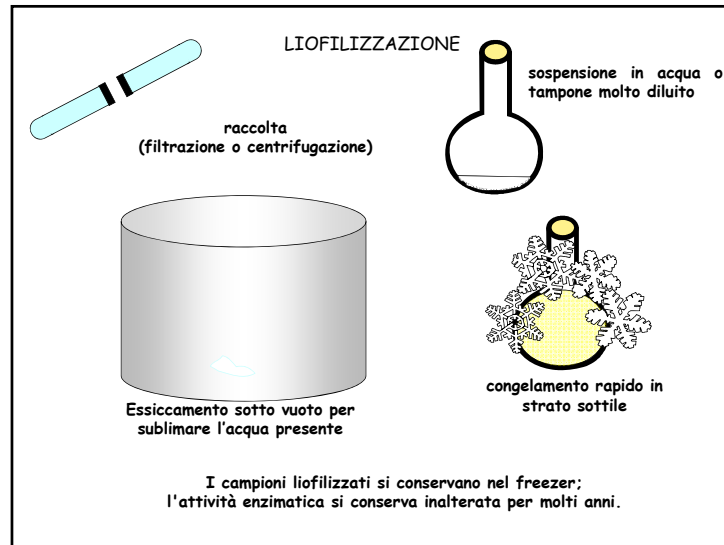
Ossidoreduttasi

Deidrogenasi

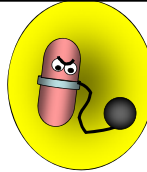
TECNICHE PER OTTENERE CELLULE ESSICcate

LIOFILIZZAZIONE

ESSICCAMENTO IN ACETONE



L'immobilizzazione è particolarmente vantaggiosa se:

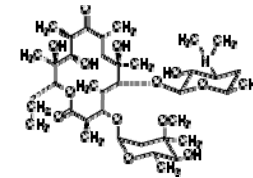


gli enzimi sono intracellulari e/o l'estrazione li rende instabili

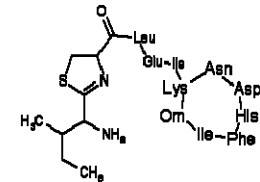
i microrganismi non contengono enzimi in grado di interferire con la reazione o, se presenti, possano essere allontanati facilmente

se i composti da trasformare o i prodotti da ottenere siano a basso peso molecolare

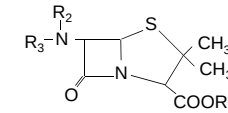
Alcune reazioni di bioconversioni con cellule immobilizzate per la produzione di antibiotici



Streptomyces: macrolidi



Bacitracina (*Bacillus*)



6-APA, intermedio della sintesi delle penicilline, base per la costruzione di penicilline semisintetiche (*E.coli*)

LEGAME AD UN SUPPORTO:

le cellule si legano direttamente a supporti insolubili

come polisaccaridi
(cellulosa, destrano, carragenani)

Proteine
(gelatina, albumina)

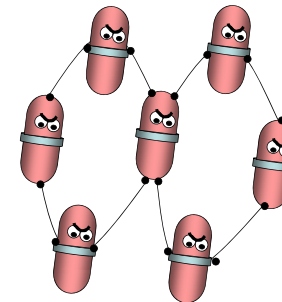


polimeri sintetici
(resine, cloruro di polivinile)

materiali inorganici
(sabbie o argille porose).

Uno dei primi tentativi di immobilizzazione di cellule fu effettuato con cellule di *E. coli* e di *Azotobacter* per ottenere l'ossidazione dell'acido succinico

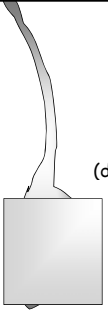
CROSS LINKING



Studiato con glutaraldeide o il toluene-di-isocianato. Comporta perdita di attività enzimatica (fino al 34%) per ora quindi poco usato ma allo studio

INTRAPPOLAMENTO

I polimeri più comuni sono



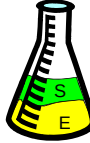
poliacrilamide
(da usare rapidamente, non polimerizzata tossica per le cellule)

alginato
(flessibile, gelificazione con ioni calcio, adatto a cellule molto delicate, anche protoplasti)

Carragenani
(economici, usabili in condizioni blande, non dannose)

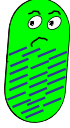
REAZIONI IN MISCELE DI SOLVENTI

Se il substrato è insolubile in acqua ma questa è necessaria per l'integrità spaziale del sito attivo dell'enzima e come componente delle reazioni




si può ricorrere a miscele emulsionate, in cui la fase acquosa mantiene l'attività enzimatica mentre quella organica (principale) fa da solvente per il substrato e per il prodotto.

Problemi dell'iper-produzione di proteine ricombinanti nei batteri





La proteina accumulata può essere tossica per l'ospite batterico e le colture non crescono a sufficienza

L'accumulo nel citoplasma può causare la precipitazione in corpi inclusi, insolubili

A questi problemi è possibile ovviare

Usando un promotore regolato che permetta l'espressione del prodotto genico solo dopo il raggiungimento di una biomassa adeguata

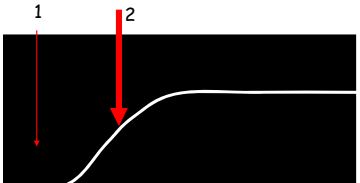
Mettendo in fusione l'orf con una sequenza segnale batterica per esportare il prodotto nel periplasma

Anche i composti lipofili possono essere trasformati ma vanno resi accessibili

L'uso di solventi caldi disperde più finemente le particelle, conferisce loro una struttura amorfa (non cristallina) e aumenta la resa



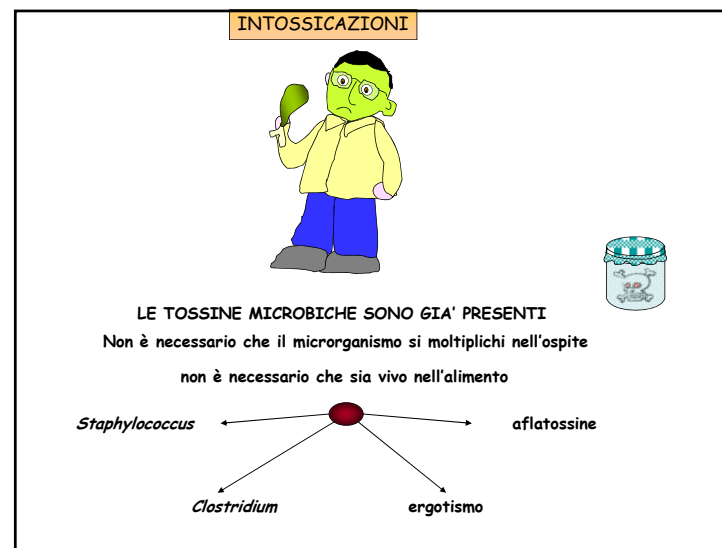
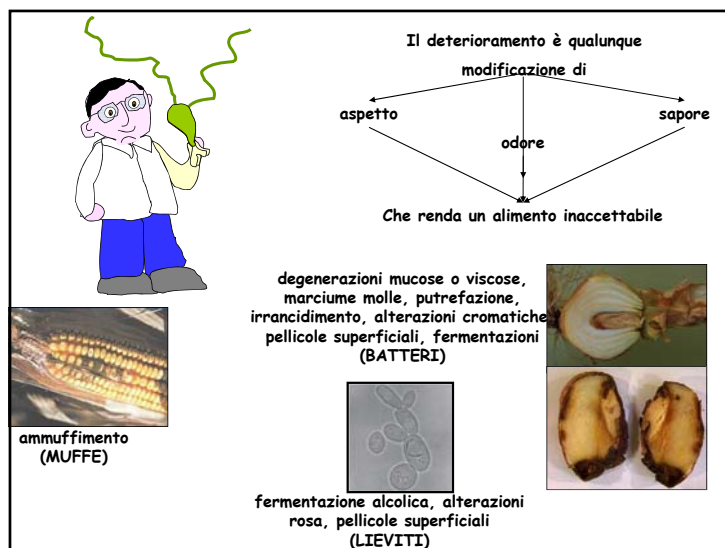
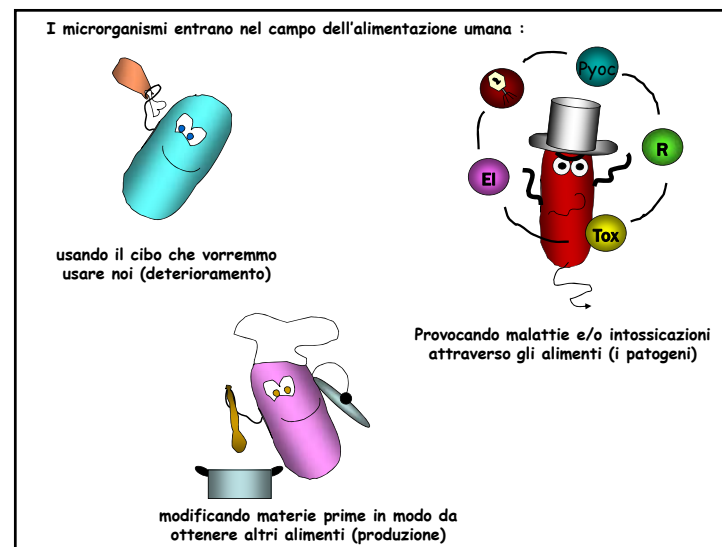
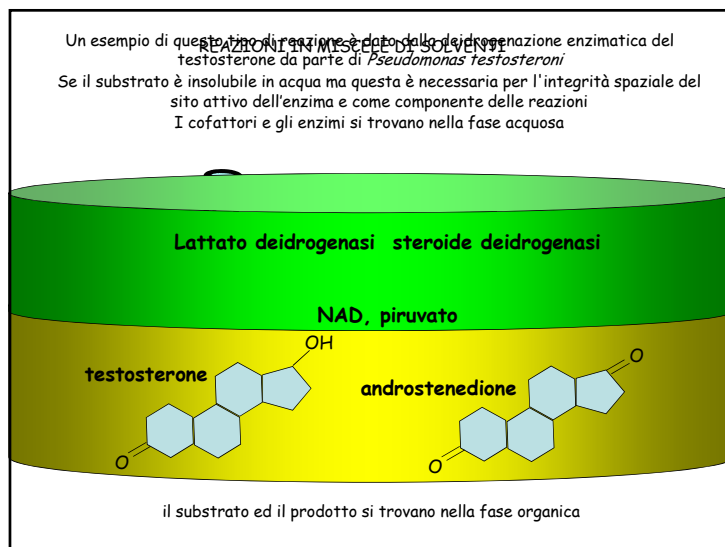
I substrati tossici (es. antibiotici o antitumorali) inibiscono la crescita e la produzione enzimatica se aggiunti in un momento precoce del ciclo di crescita

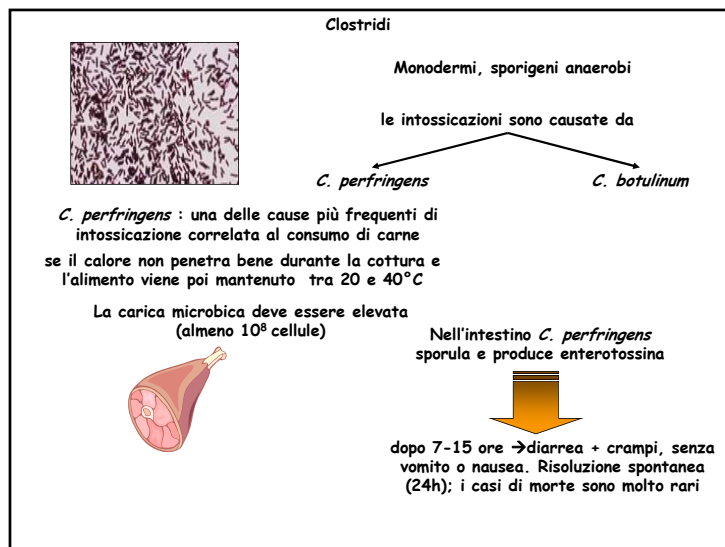
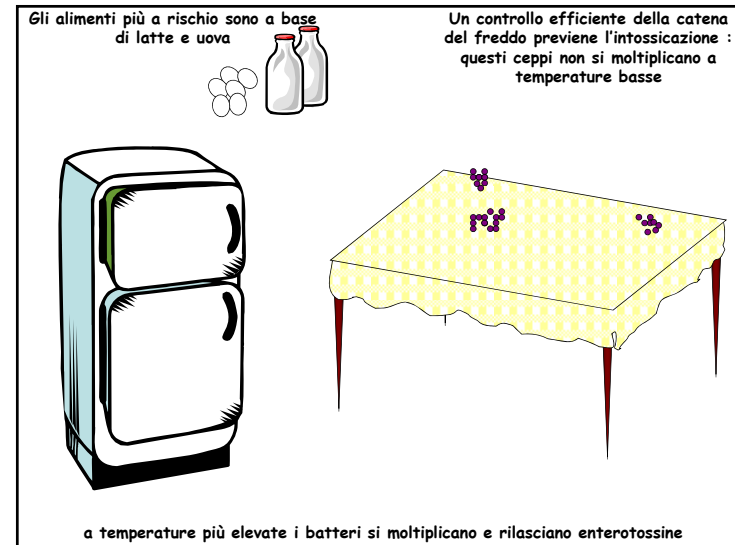
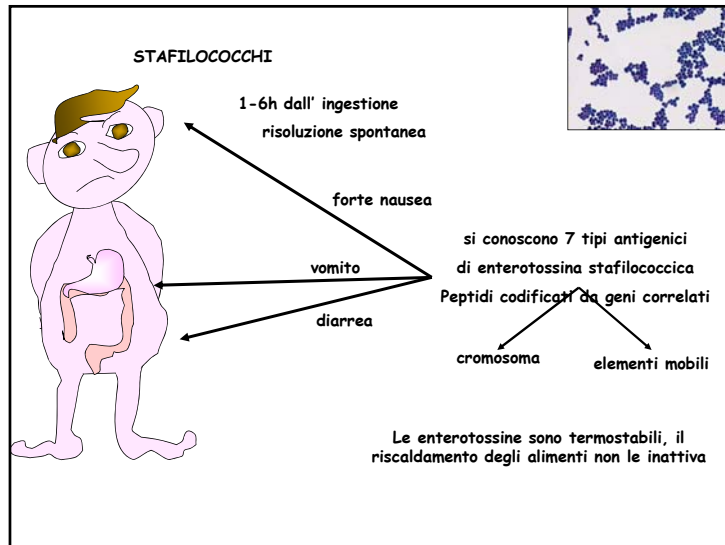


In questo caso si induce la sintesi dell'enzima con una piccola quantità di substrato all'inizio della crescita, aggiungendo il resto nella tarda fase logaritmica

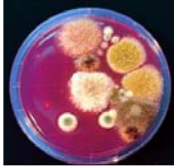
Quando le cellule sono ancora inducibili ma gli effetti della tossicità sulla massa cellulare sono molto meno importanti

Lo stesso vale per i substrati che non sono direttamente tossici ma che vanno disciolti in solventi che lo sono

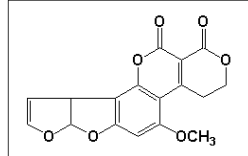




AFLATOSSINE



A. flavus è facilmente riconoscibile dal colore particolare, ma le aflatossine sono prodotte anche da un'altra specie: *A. parasiticus*



Le aflatossine danneggiano il fegato e i reni e sono carcinogene per l'uomo



La tossicità di *A. flavus*

fu scoperta dopo un'ecatombe di tacchini nutriti con noccioline contaminate

La contaminazione può avvenire su diversi substrati, ed è facilitata da una cattiva aerazione (sili di magazzinaggio)

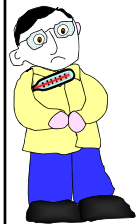
Le aflatossine sono un notevole rischio per la salute umana nei paesi in via di sviluppo, a causa degli alti livelli di prodotti contaminati che vengono consumati

La prevenzione deve essere svolta attraverso controlli ripetuti e accurati per escludere le materie prime contaminate da tutti i processi dell'industria alimentare

PATOGENI

Oltre al problema del deterioramento esiste quello della trasmissione di malattie

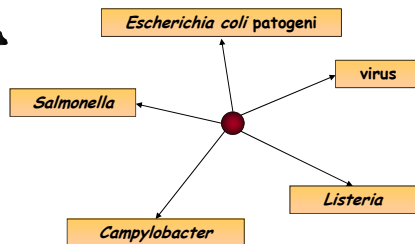
INFEZIONI



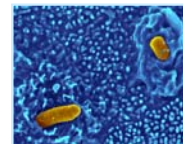
un certo numero di patogeni attivi devono essere ingeriti con l'alimento



devono attecchire perché si manifestino i sintomi



Salmonellosi



molti sierotipi possono essere causa di gastroenteriti nell'uomo, il più frequente è *S. typhimurium*

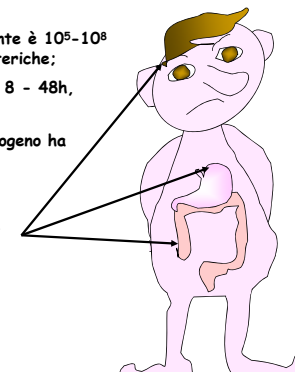
Nelle gastro-enteriti l'infezione è limitata all'intestino

La carica infettante è 10^5 - 10^8 cellule batteriche;

l' incubazione 8 - 48h,

i sintomi compaiono solo dopo che il patogeno ha colonizzato l'epitelio intestinale

mal di testa, diarrea, vomito, febbre (2-3 giorni)



La fonte di contaminazione sono animali a sangue caldo per produzioni alimentari (polli, bestiame) che possono albergare le salmonelle nel tratto intestinale



Gli alimenti maggiormente a rischio sono pollame, carni, insaccati da consumare crudi, preparazioni a base di uova crude

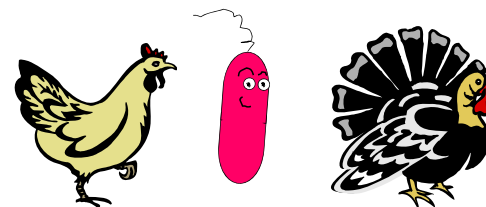


Campylobacter jejuni

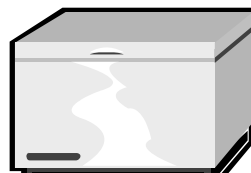
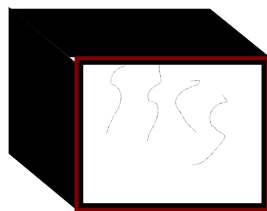
una delle principali cause di diarrea nei paesi industrializzati

L'incidenza è superiore a quella del più noto *E. coli* O157-H7

Un'indagine su polli freschi interi (Lexington-96-97) ne ha rivelato la presenza di nel 100% dei campioni



Una cottura adeguata uccide il microrganismo

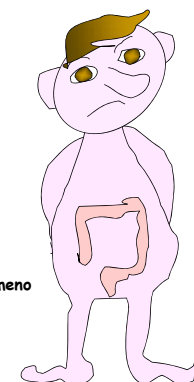


Anche il congelamento abbassa notevolmente la contaminazione

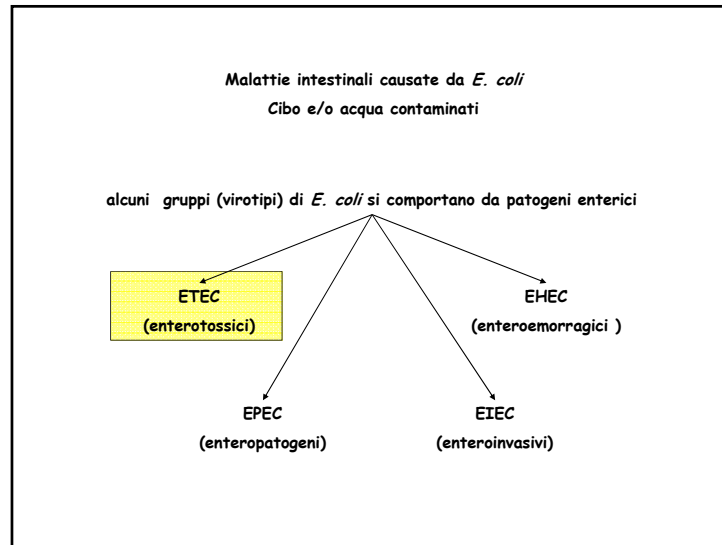
C. jejuni provoca una diarrea con forti dolori addominali e febbre alta

Dalla durata di 7-10 giorni..

In casi rari può indurre un fenomeno autoimmune (sindrome di Guillain-Barre)



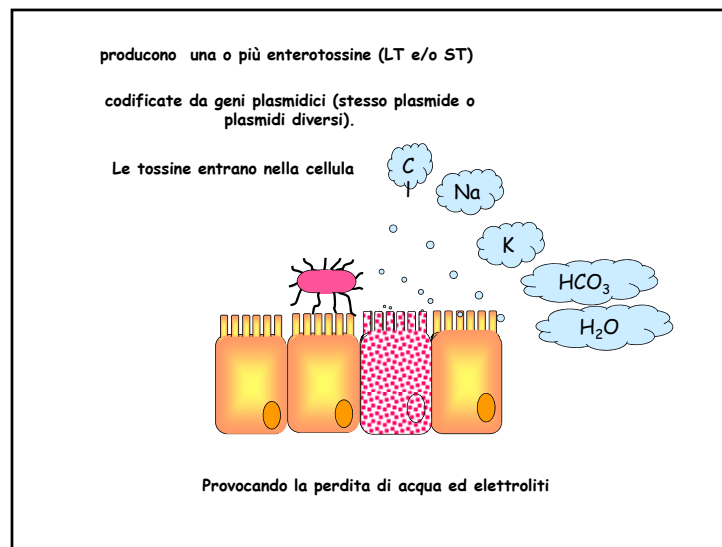
Caratterizzata da una paralisi generalizzata, e che può essere mortale



ETEC

diarrea senza febbre in bambini e nei viaggiatori nei paesi sottosviluppati o con condizioni igienico-sanitarie insufficienti.

I disturbi possono essere di poco conto o arrivare a manifestazioni simili al colera



LT è molto simile alla tossina colerica (CT):
ha la stessa struttura, lo stesso recettore, lo stesso medesimo meccanismo d'azione

ST: in realtà una famiglia di piccoli peptidi di circa 2000 dalton
Agiscono in modo simile a LT

La minore gravità delle patologie da ETEC rispetto al colera è dovuta alla localizzazione periplasmica di LT mentre CT viene secreta da *Vibrio* all'esterno della cellula.

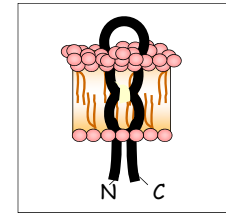
EPEC

provocano una diarrea acquosa nei bambini



Si attaccano alla mucosa dell'ileo grazie ad un'adesina

Il sistema di secrezione III trasloca il recettore Tir nella membrana dell'enterocita



L'adesina (Intimina) si lega a Tir



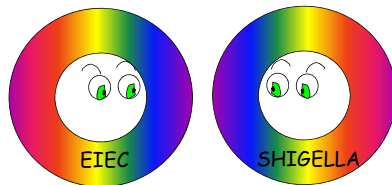
Si forma il "pedistallo"

L'orletto a spazzola viene danneggiato gravemente

la diarrea è conseguenza di un malassorbimento

EIEC

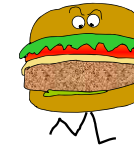
molto simili a *Shigella*: penetrano e si moltiplicano nelle cellule epiteliali del colon, causando una necrosi cellulare massiva.



Possiedono lo stesso megaplasmide di virulenza di *Shigella*.
Non producono però la tossina di Shiga o enterotossine.

EHEC

comprende un solo ceppo (O157:H7) che provoca diarrea con abbondante sangue nelle feci e assenza di febbre



in età pediatrica può provocare una insufficienza renale acuta fatale
(sindrome uremico-emolitica- HUS)

Produce una tossina Shiga-like, codificata da un batteriofago, la cui produzione aumenta in condizioni di scarsa disponibilità di Ferro

La malattia è associata in genere con l'ingestione di hamburger poco cotti.



Le fonti di contaminazione possono essere macelli o punti di distribuzione

I COLI "CATTIVI"

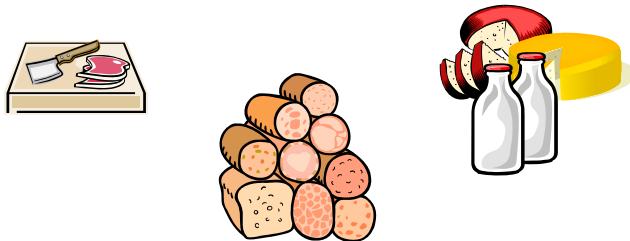
VIROTIPO	INVASIVITÀ	ADESINE	TOSSINA	PATOLOGIA
EIEC	SÌ	OMP	NO	SIMIL-DISSENTERICA
EPEC*	NO	INTIMINA	NO	D. DA MALASSORBIMENTO
EHEC*	MODERATA	FIMBRIE ?	VERO-	COLITE EMORRAGICA
ETEC	NO	FIMBRIE	LT+ST	D. INFANTILE D. DEL VIAGGIATORE

* L'infiammazione ha un ruolo importante nella patogenesi

Listeria: la listeriosi è principalmente una zoonosi

L'uomo si contagia per ingestione di alimenti contaminati

Le fonti di infezione sono carni fresche, insaccati e latticini conservati a 4°C per lungo tempo

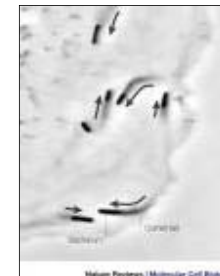


Listeria è particolarmente resistente alla salagione e a molti disinfettanti

È una specie psicrofila
(cresce a temperatura di refrigerazione)

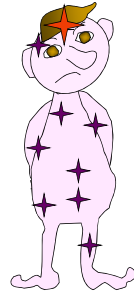
Produce internaline, che le permettono di entrare in fagociti non professionali

Si sposta da una cellula all'altra formando code di actina



LISTERIOSI

batteriemia
granulomi disseminati
meningite



È necessaria l'ospedalizzazione

Passa dalla madre al feto

la mortalità è del 20%

In caso di listeriosi si procede a:

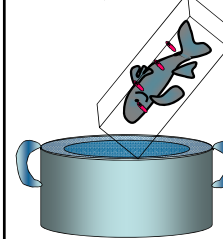
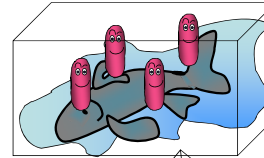
Ritiro immediato del prodotto
dal commercio

Chiusura dell'impianto e trattamento con
calore e radiazioni

CONSERVAZIONE: METODI FISICI

DISIDRATAZIONE

impediscono la replicazione dei
microorganismi, ma non li uccidono

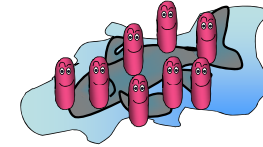


TEMPERATURE SOTTO LO ZERO

Un alimento reidratato o scongelato
ha la stessa carica microbica che
aveva al momento del trattamento

Il processo di scongelamento può anche
favorire la crescita dei microorganismi

danneggia le cellule e rende più accessibili
ai batteri le sostanze nutritive



Una volta scongelati, quindi, i cibi vanno
consumati o cucinati in tempi brevi

CALORE: se i processi successivi mantengono la
sterilità, i tempi di conservazione sono lunghi

PASTORIZZAZIONE: per alimenti
che non sopportano l'autoclavazione

elimina i patogeni e abbatte la carica microbica
la conservazione è limitata nel tempo

Pastorizzazione: 62,8 °C per 30'

HTLT 70°C per 15'

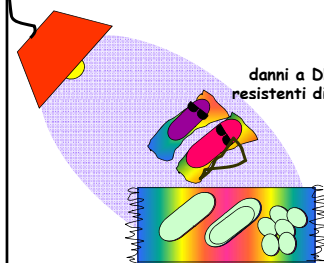
UHT 141 °C per 2 '' (latte)



IRRADIAZIONE:

danni a DNA e membrane: *Listeria* e *Salmonella* sono più
resistenti di *E. coli*, *Campylobacter* e *Staphylococcus*

Gli additivi nei cibi possono abbassare
l'efficienza del processo



Atmosfere modificate: (basso O₂ ed alta
CO₂; vuoto) inefficaci su *C. botulinum* e
poco efficaci su *Listeria*

un alimento in apparente stato di perfetta
conservazione potrebbe essere contaminato da livelli
anche alti di questi due patogeni

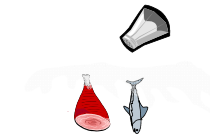


CHIMICI

NaCl: abbassa Aw, limita la solubilità di
O₂ causa la perdita di Mg²⁺

Come agente unico si usa per la salagione (carni e pesce)
in altri trattamenti fa da adiuvante

Ritarda la crescita batterica in
burro e formaggi



Stafilococco e *Listeria* e miceti sono alotolleranti; nelle carni suine il sale può avere un
effetto termoprotettivo per *Listeria*

Nitriti: usati per la carne, sono antiossidanti e mantengono le qualità organolettiche (colore = nitrosomioglobina)

L'uso dei nitriti è combinato con quello di diverse spezie che prevengono la formazione di nitrosamine, composti cancerogeni



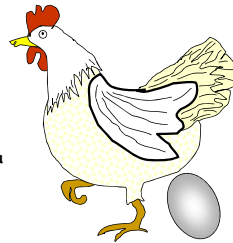
Fosfato trisodico: nella decontaminazione di carcasse di pollo, abbassa la carica di *Listeria* di 1-2 log

E. coli O157:H7, *Salmonella* e *Campylobacter* sono più sensibili

LISOZIMA: attivo contro i Gram-positivi

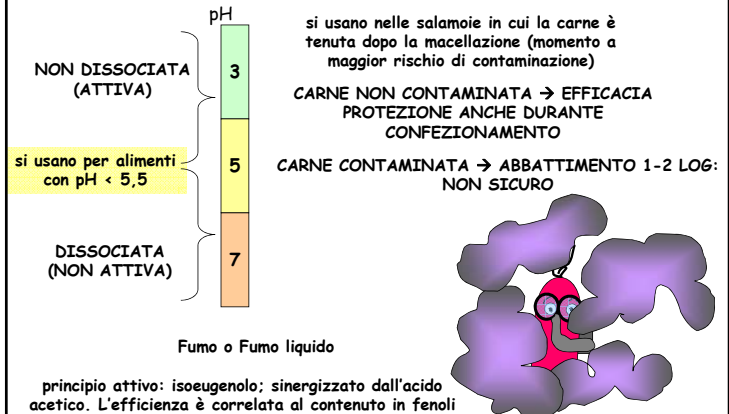
Lisa il peptidoglicano in soluzioni ipotoniche; termostabile (anche 100 °C) a pH < 5,3 ma si inattiva a temperature inferiori a pH più elevato

La principale fonte commerciale è l'uovo di gallina



acidi organici: sono usati come additivi ma non tutti sono antimicrobici

eventuali cellule sopravvissute (specialmente *Listeria*) diventano tolleranti anche a etanolo e H₂O₂



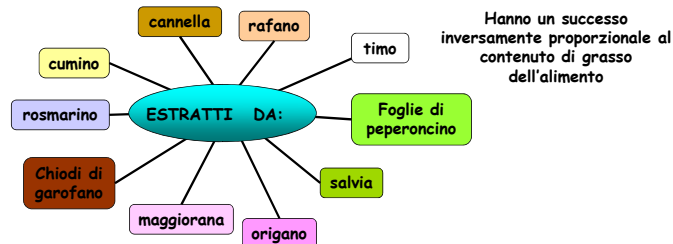
Molti estratti di erbe aromatiche e spezie contengono principi antimicrobici attivi che contribuiscono al gusto

Succhi e vapori di aglio e cipolla sono attivi contro la crescita e la produzione di tossine di diversi microrganismi



Il principio attivo è l'allicina (diallil-tiosulfinato) che inibisce l'azione di enzimi contenenti gruppi sulfidrilici

La cipolla contiene anche composti fenolici (catecolo e acido protocatecuico) che coadiuvano l'effetto antimicrobico



agenti attivi: oli essenziali contenenti terpeni; aldeide cinnamica (cannella) eugenolo (derivato fenolico-chiodi di garofano)

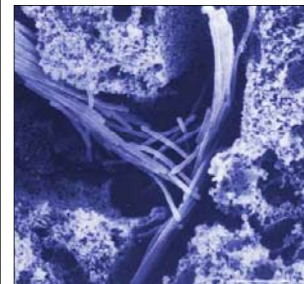
BIOLOGIA



Aumentata mercato per cibi "naturali" → aumentato consumo di alimenti congelati o surgelati non pretrattati

In assenza di altri procedimenti questi alimenti possono non essere sicuri: la maggior parte dei congelatori "domestici" non raggiunge temperature sufficienti a garantire la stasi microbica

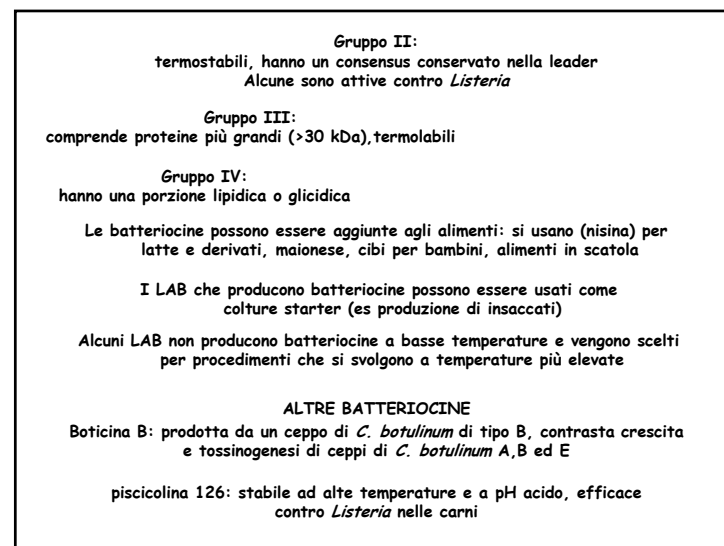
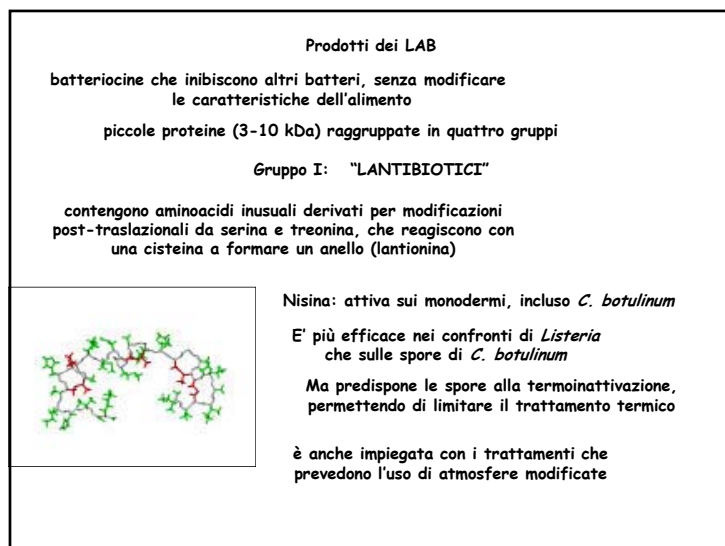
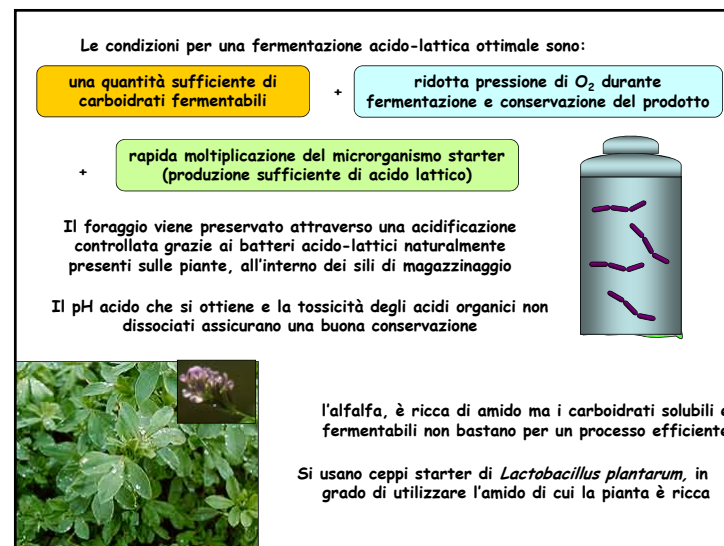
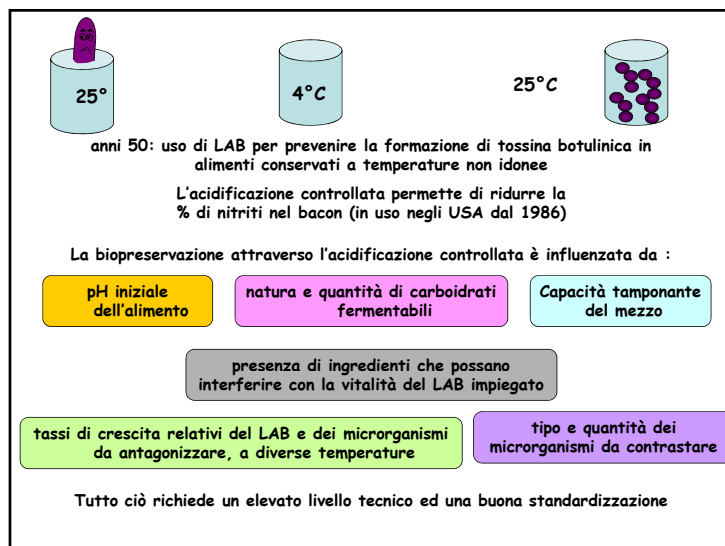
impiego di metodi di conservazione "biologica" attraverso



"LAB"
(Lactic Acid Bacteria)

loro prodotti metabolici

O entrambi



IL CONTROLLO DEGLI ALIMENTI

escludere la presenza dei patogeni

verificare che la carica microbica totale si mantenga al di sotto della soglia stabilita per legge per ogni categoria di alimenti

nei controlli vanno tenuti presenti i problemi correlati alla presenza di

CELLULE DANNEGGIATE

CELLULE "VNC"
Vitali Non Coltivabili

I trattamenti di conservazione possono danneggiare le cellule microbiche pur senza ucciderle

A volte le cellule danneggiate non crescono durante i test di controllo e possono falsarli

terreni che favoriscano la riparazione del danno ne rivelano la presenza

Il rapporto tra cellule uccise e cellule solo danneggiate varia a seconda delle condizioni e della specie batterica in oggetto



Listeria



28°C



52°C

Morte
3-4 log



37 - 42°C



52°C

danneggiamento
3-4 log
Nessuna morte

IL CONCETTO DI DANNEGGIAMENTO È MOLTO IMPORTANTE

se cellule danneggiate sono erroneamente considerate morte nei test preliminari, le condizioni ottimali per la sterilizzazione possono essere stabilite in modo errato

cellule danneggiate sfuggite al controllo possono riparare i danni prima della consumazione del cibo

La condizione che frena la crescita delle cellule danneggiate può essere un componente del cibo (sale...) e agire insieme a una temperatura subottimale

Il sale impedisce a cellule di *S. aureus* danneggiate dall'acido durante la fermentazione dei salumi, di riparare finché la temperatura è bassa (5 °C) ma se il prodotto finito è esposto a temperature più elevate, riparano, crescono e possono produrre enterotossina

Il processo di "riparazione" richiede sintesi de novo di RNA e di proteine e può rendersi evidente come un allungamento della fase lag della crescita.

La quantità di riparazione ed il ritmo con cui si verifica, sono influenzate da una serie di fattori ambientali

Listeria



55°C-20'



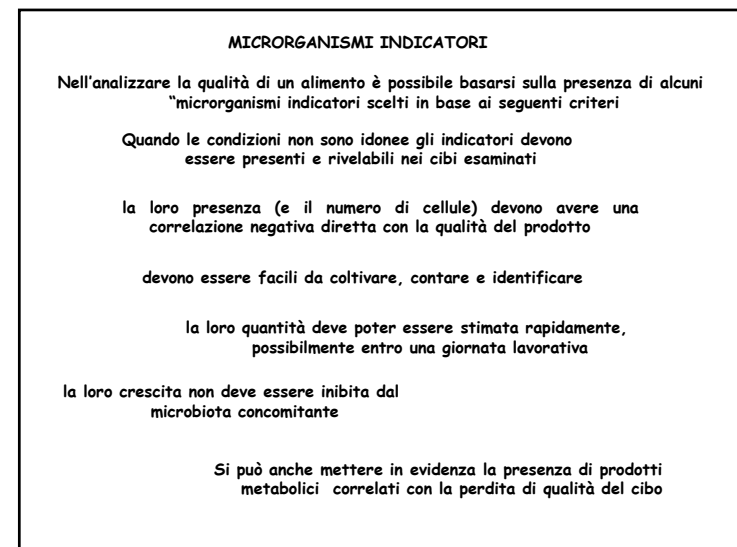
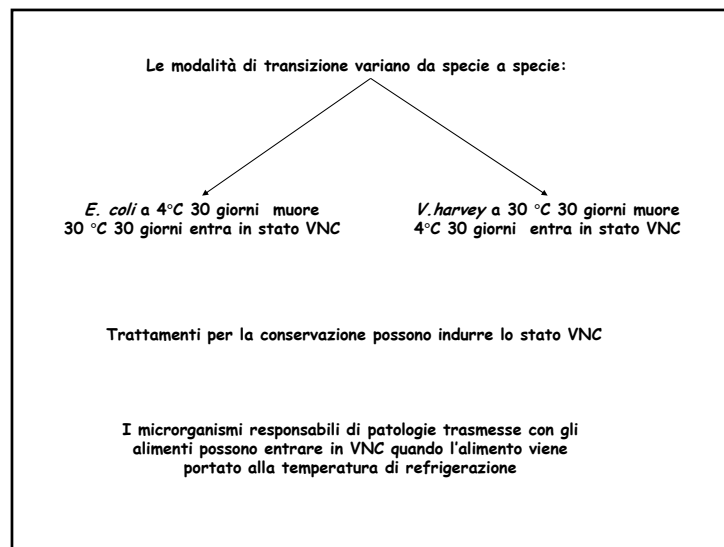
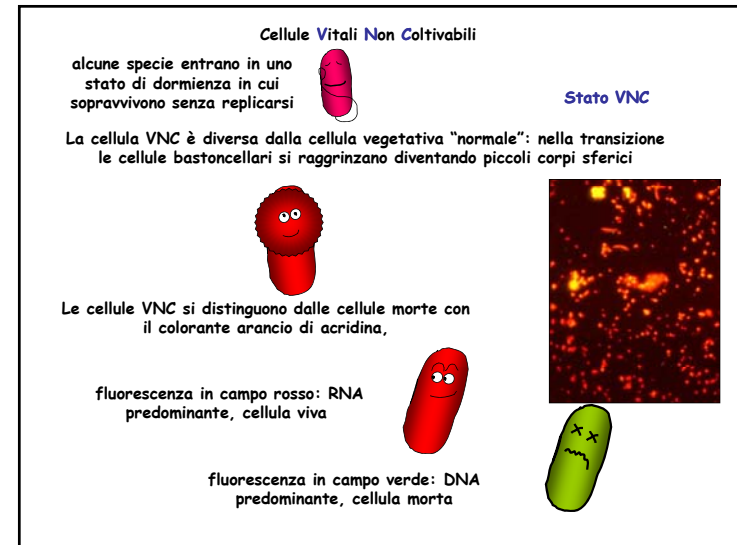
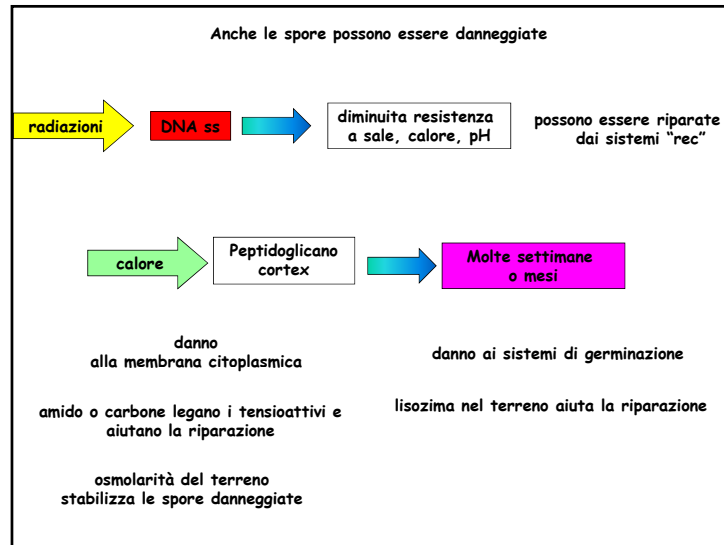
Terreno 37°C

Riparazione
Comincia subito
Completa in 9h



Latte 4°C

Riparazione
Comincia dopo 8-10 g
Completa in 16-19 g



Ricerca di Patogeni
Staphylococcus e *Salmonella*, si cercano direttamente
 in molti casi si cercano microrganismi indicatori come



E. coli
 (stessi ambienti dei patogeni enterici)



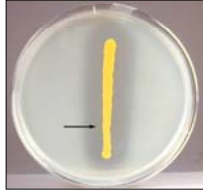
Enterococcus
 la sua presenza rivela in genere
 procedimenti di produzione inaccurati

Attività enzimatiche o tossine

termonucleasi di *S. aureus*

fosfatasi alcalina deve essere
assente dal latte pastorizzato

tossine (esame delle granaglie all'UV
per le tossine di *Aspergillus flavus*)



I PROBIOTICI:

mantengono in equilibrio funzionale il tratto intestinale
 proteggendo dai patogeni e da un eccesso di sostanze tossiche



prodotti farmaceutici



naturalmente negli alimenti

sono principalmente bifidobatteri e lattobacilli

PREBIOTICI

Composti che promuovono la
crescita dei batteri probiotici

FOS: composti frutto-oligosaccaridici
naturali che si trovano in molte piante



Non sono digeriti dall'uomo, ma sono una fonte preferenziale di
nutrimento per i *Bifidobacterium* favorendone la colonizzazione

Bifidobacterium: producono gli acidi lattico e acetico e mantengono un pH intestinale
 leggermente acido: inibiscono la crescita di molti patogeni e favoriscono quella dei
 lattobacilli

riducono la produzione di sostanze tossiche
 originate dal metabolismo di altri batteri



AMINE VASOCOSTRITTRIVE

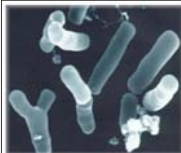
```

      graph TD
        A[AMINE VASOCOSTRITTRIVE] --> B[FENOLO]
        A --> C[INDOLO]
        A --> D[AMMONIACA]
        A --> E[CADAVERINA]
        A --> F[ISTAMINA]
        A --> G[TIRAMINA]
        A --> H[AGMATINA]
      
```

Le specie più conosciute e/o usate per ristabilire
 l'equilibrio di un microbiota intestinale alterato sono:

B. infantis e *B. breve*, intestino dei neonati

B. longum: adolescenza e età adulta



MICRORGANISMI E PRODUZIONE DI ALIMENTI





BIRRA: La prima testimonianza scritta risale all'epoca dei sumeri (3700 A.C)

Il codice di Hammurabi decretava la morte per chi la preparasse senza osservare le regole stabilite, o ne vendesse senza autorizzazione

in alcuni paesi la birra si prepara secondo usanze diverse dalle nostre

Come quella di masticare i chicchi d'orzo o sputare nella miscela

Il motivo "scientifico" dietro a questa usanza è l'effetto della ptialina della saliva che accelera la degradazione dell'amido



lo stesso effetto si può ottenere in altro modo e le materie prime di un birrificio sono

Malto Acqua Lievito
Luppolo CO₂



BIRRA = fermentazione di malto + luppolo

amido dell'orzo → glucosio → etanolo + CO₂

BRASSAGGIO

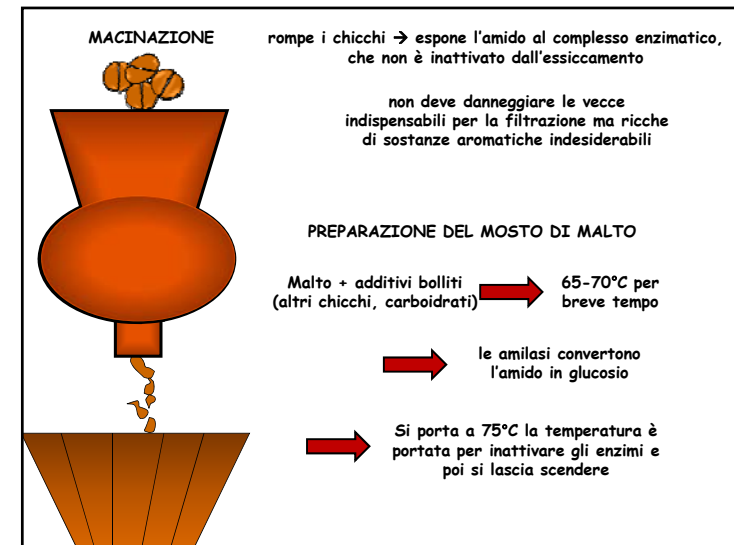
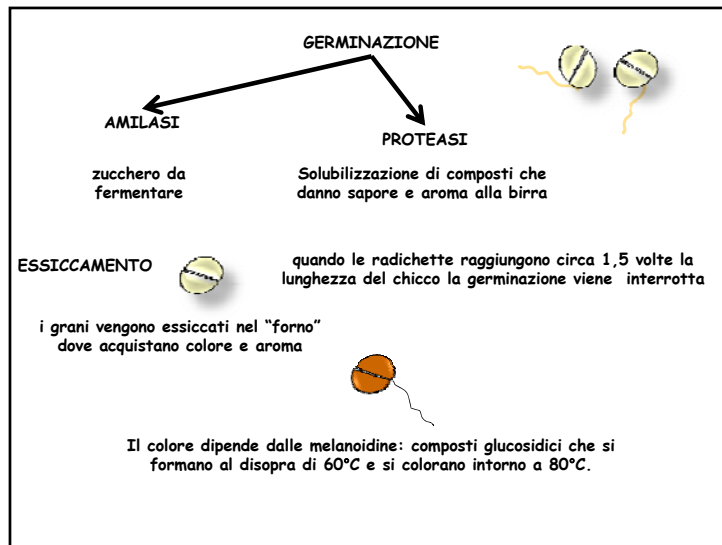
- 1 - Preparazione del malto 2 - Preparazione del mosto 3 - bollitura con il luppolo
- 4 - fermentazione 5 - invecchiamento 6 - finitura

PREPARAZIONE DEL MALTO
(substrato per la fermentazione)
1) germinazione



IMMERSIONE IN ACQUA (5 - 7giorni)

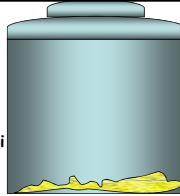
L'acqua deve essere microbiologicamente pura per evitare lo sviluppo di muffe



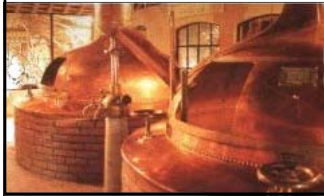
FILTRAZIONE

Dopo la digestione enzimatica la miscela passa in un tino d'acciaio e continuamente mescolata

Il mosto (soluzione di maltosio, destrine, proteine e altri prodotti) è filtrato attraverso le bucce e i detriti sedimentati

**BOLLITURA CON IL LUPPOLO**

Al mosto, convogliato nella caldaia, si aggiunge il luppolo (fiori femmina della pianta *Humulus lupulus*)



durante la bollitura vengono estratti gli acidi amari e le resine dal luppolo, importanti per il sapore e l'aroma

le resine contribuiscono a prevenire alterazioni batteriche

FERMENTAZIONE

il lievito trasforma gli zuccheri e gli aminoacidi presenti nel mosto

Il mosto è raffreddato a temperature adatte alla fermentazione; L'insufflazione di aria sterile fornisce l'ossigeno indispensabile

alcol

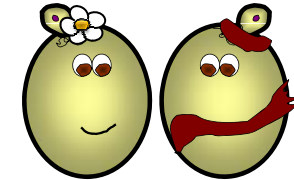
sostanze aromatiche

CO₂

La temperatura varia a seconda del tipo di birra desiderata

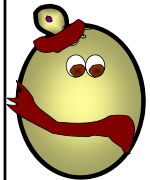
fino al 1700 si usava la sola varietà *S. cerevisiae* (fermentazione alta: 15 - 20° C)

Poi è stato scoperto *S. carlsbergensis*, che svolge una fermentazione "bassa" (4 - 6° C)

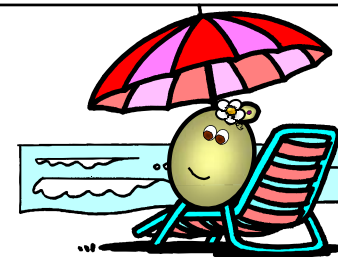
**FERMENTAZIONE BASSA**

Saccharomyces carlsbergensis si impiega fra i 5 - 8° C, poiché >10 °C il prodotto può prendere un gusto sgradevole

Verso la fine della fermentazione si divide in due fasi: grossi fiocchi che salgono verso la superficie e cellule di sfaldamento che si depositano sul fondo



Saccharomyces cerevisiae, invece, lavora fra i 16 e i 23° C



la fermentazione ALTA è più rapida di quella BASSA

Dopo 3-4 giorni il lievito risale in superficie e viene recuperato con schiumature

il lievito recuperato serve come inoculo per successive fermentazioni



BIRRE A FERMENTAZIONE NATURALE (SPONTANEA)

birre di frumento prodotte, senza inoculo di lievito, nel Payottenland, (regione vicino a Bruxelles)

Sfruttano i lieviti selvatici presenti nell'aria, particolarmente adatti al brassaggio

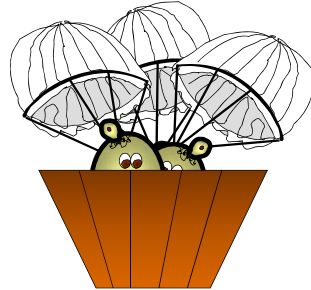
La più nota delle birre che derivano da questa preparazione è la Lambic

Le Birre "rifermentate in bottiglia" subiscono una 3° fermentazione, con un nuovo inoculo, prima di essere incapsulate



sono in genere "birre di abbazia" o "strongale" molto forti

Le birre di frumento (weizenbier e bière blanche) non sono filtrate e il lievito resta nella bottiglia ma mantengono una gradazione normale



MATURAZIONE

la birra giovane matura in grossi tini a 0 - 2 °C, per 4-5 settimane

la birra si satura di CO₂, si chiarifica (i residui di lievito e proteine si depositano) e il gusto migliora

birre particolarmente pregiate maturano anche diversi mesi



Alla fine del processo la birra viene filtrata per toglierle i residui di opacità e infine imbottigliata o infusata

ALTERAZIONI MICROBICHE

Nella maggior parte dei casi sono causate da batteri; le specie frequenti sono relativamente poche

Gram-positive:
Lactobacillus e *Pediococcus*

sono resistenti all'etanolo, non richiedono ossigeno, si riproducono bene a pH basso fino a 3,5

La fonte di contaminazione è l'inoculo di lievito o l'aria



Provocano intorbidimento, acidità e aromi indesiderati come quello dolciastro vanigliato o di miele, provocati dal diacetile

Alcuni ceppi producono glicocalice e danno una crescita gelatinosa.

Gram-negativi aerobi o microaerofili

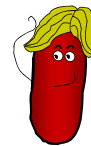
Gli acetobatteri (*Acetobacter*, *Acetomonas*) avviano una fermentazione acetica prima che il lievito abbia esaurito l'O₂ e formano un film oleoso o simile alla muffa. Possono essere portati dall'inoculo o dalle drosofile

Enterobacteriaceae:

Klebsiella, *Citrobacter*, *Enterobacter*, ("coliformi") attaccano il mosto nelle fasi di raffreddamento o durante la fase lag del lievito all'inizio della fermentazione

Zymomonas (mobile bastoncino)

principale agente anaerobio di deterioramento, specialmente nella fermentazione alta. La fonte di contaminazione è rappresentata da terreno (contaminazione del macchinario). Molto spesso si trova nella fase di imbottigliamento

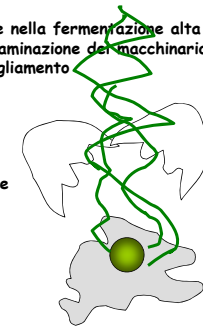


Pectinatus: cresce tra 15 e 40 °C (optimum 30°C), pH 4,5-6; strettamente anaerobio, produce H₂S, acidi acetico e propionico.

Il deterioramento avviene nella fase di imbottigliamento e si previene con pastorizzazione e clorazione.

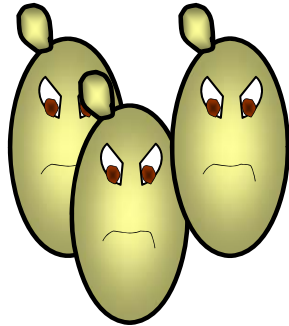
Le possibili fonti di contaminazione sono acqua, sistemi di drenaggio, olio lubrificante (contatto accidentale con la birra o l'acqua)

La birra diventa torbida con un forte odore di uova marce



LIEVITI SELVAGGI

problemi nella fermentazione possono essere causati dalla presenza di lieviti "selvaggi" (contenuto in alcol non ottimale, aromi particolari, torbidità..)



Le specie implicate sono:
Brettanomyces, *Schizosaccharomyces*,
Zygosaccharomyces

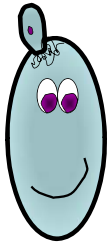


Brettanomyces, in particolare, conferisce un "odore di stalla" al prodotto finale

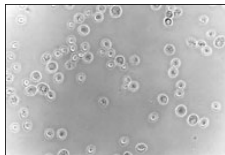
VINO



Nei processi di vinificazione possono essere coinvolti lieviti e batteri, con effetti positivi o negativi sulla qualità del prodotto

LIEVITI DEL VINO
(*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*)

Ceppi che tollerano concentrazioni elevate di etanolo e zucchero



fermentano completamente il succo d'uva dando un prodotto con caratteristiche vinose e privo di aromi indesiderabili

I BATTERI MALOLATTICI
(batteri lattici, producono acido lattico anche dall'acido malico)

Vengono a volte usati per fermentazioni secondarie per correggere mosti eccessivamente acidi.

RACCOLTA

i grappoli devono giungere a piena maturazione sulla pianta e colti quando il contenuto zuccherino è massimo



SPREMITURA:

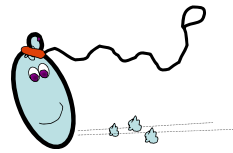
Si effettua con apparecchiature che trituranò l'uva grossolanamente, e separano i raspi dagli acini.

La separazione è importante per via del tannino contenuto nei raspi (0,8-4%).



Le uve rosse usate per vini bianchi (Champagne) subiscono una spremitura più delicata, per sola pressione

CONTROLLO DELLA FERMENTAZIONE



INOCULO: IMPIEGO DI "STARTER"

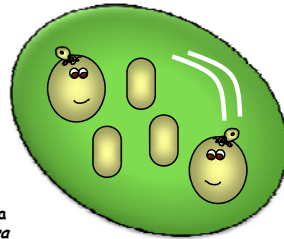
Gli acini sono ricoperti da batteri, muffe e lieviti

Il lievito, più frequente è *Saccharomyces* ma si trovano anche *Pichia*, *Torulopsis*, *Kloeckera*

In passato l'inoculo era rappresentato dai lieviti già presenti sugli acini ma questo procedimento non dava garanzie

gli starter riducono i rischi di alterazioni: la quantità di cellule "giuste" aggiunta (circa 10⁶/ml) garantisce l'esito della fermentazione se le altre condizioni sono osservate

INOCULO
NUTRIENTI
TEMPERATURA



NUTRIENTI

LA QUALITÀ DEI NUTRIENTI DIPENDE STRETTAMENTE DALLA QUALITÀ DELL'UVA RACCOLTA

Il giusto momento per la raccolta è molto importante

Troppo presto → Poco zucchero → vini acquosi a poco alcolici, soggetti a deviazioni della fermentazione

Troppo tardi → Appassimento, molto zucchero, poca acqua → vini molto alcolici, ma a bassa acidità

Sia il contenuto alcolico che l'acidità sono fattori che servono a mantenere il controllo della fermentazione

è importante la presenza di O₂ all'inizio della fermentazione (poi deve essere consumato per evitare reazioni di ossidazione)

CONTROLLARE LA TEMPERATURA PER IMPEDIRE UN ECCESSIVO SVILUPPO DI CALORE

La temperatura deve essere modulata per:

facilitare la crescita del lievito e la trasformazione zucchero → alcool

estrarre in modo ottimale aromi e colore

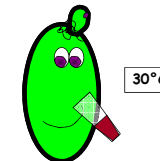
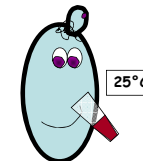
permettere l'accumulo dei prodotti desiderabili

impedire che il calore metabolico del lievito innalzi la temperatura causando un eccessivo rallentamento della crescita o addirittura la morte del lievito

OPTIMUM PER LA CRESCITA DI *Saccharomyces* = 25 °C

iniziare la fermentazione a questa temperatura, tuttavia, inevitabile porterebbe a raggiungere 30°C

questa temperatura induce una marcata sensibilità agli effetti tossici dell'alcol e le cellule di lievito muoiono



Se la temperatura si alza eccessivamente, inoltre, i batteri ambientali termoresistenti possono prendere il sopravvento e causare l'arresto definitivo della fermentazione alcolica

VINI BIANCHI

la temperatura ideale per formare mantenere i prodotti secondari desiderabili è 10 - 20 °C

temperature così basse richiedono una fermentazione prolungata (6-10 settimane) con il rischio che lo zucchero non venga trasformato completamente

se si scende sotto i 10°C esiste anche il rischio della morte del lievito.

La maggior parte delle fermentazioni per produrre vini bianchi quindi, viene avviata a 20 °C e mantenuta entro i 25°C.

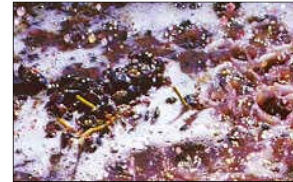


VINI ROSSI

a temperature troppo basse l'estrazione del colore non è ottimale

Le fermentazioni vanno avviate e mantenute a 22 -28°C, controllando strettamente il procedimento mediante scambiatori di calore

va particolarmente curato l'aspetto microbiologico della fermentazione perché la temperatura di fermentazione è permissiva per i procarioti.



IL CAPPuccio

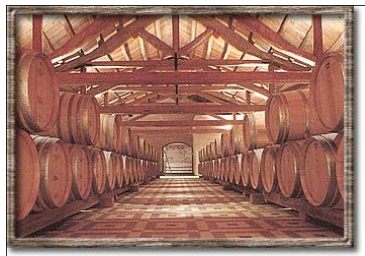
la fermentazione avviene in presenza delle vinacce che tendono a salire sulla superficie del mosto

. Il "cappuccio" però ostacola la fermentazione, inibisce l'estrazione di pigmenti ed aromi, e può causare un eccessivo aumento della temperatura

deve essere immerso nella massa almeno due volte al giorno. Per grossi tini questo si ottiene con pompe che pescano il mosto dal fondo e lo ri-immettono nel tino dall'alto.

Il mosto va tenuto al riparo dall'aria mentre fermenta, per prevenire ossidazioni indesiderate

L'ossigeno deve essere presente all'inizio della fermentazione ma essere poi consumato dal lievito che cresce.



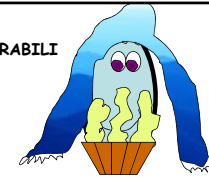
Se tutto va bene questo lavoro porta ad ottenere vino

SOPPRIMERE LA CRESCITA DEGLI ORGANISMI INDESIDERABILI

Un tempo i tini venivano trattati bruciandoci dentro bastoncini di zolfo

Oggi lo zolfo si usa sotto forma di SO₂ (100 ppm)

S. Cerevisiae infatti è più resistente dei lieviti selvatici che potrebbero prendere il sopravvento



ALTERAZIONI

FIORETTA

Mycoderma vini ossida l'alcool e deteriora il prodotto delle fermentazioni a che non abbiano ottenuto un tenore alcolico sufficiente, formando un velo superficiale sul mosto

SPUNTO-ACESCENZA

Colpisce vini poco alcolici o acidi; è provocato da acetobatteri: *Acetobacter aceti* e *A. oxydans*

trasformano l'alcol in acido acetico + etil-acetato (la principale componente sensoria dell'aceto) e il glucosio in acido gluconico.

AMARORE

Colpisce vini già imbottigliati se le uve non erano state sufficientemente selezionate (acini guasti) o se la vite era stata attaccata dalla peronospora

è causato da *Bacillus amaracrylus* che fermenta il fruttosio → mannitolo e si manifesta con un sapore scipito che poi diventa amaro (simile al chinino)

GIRATO (MERCORELLA, CERCONI)

fermentazione tartarica, svolta da alcuni procarioti, che si manifesta con l'intorbidamento e il sobbolimento incontrollabile del mosto
il problema riguarda in genere mosti con un alto pH di partenza

Le specie più frequenti sono lattobacilli che producono acido lattico e acido acetico

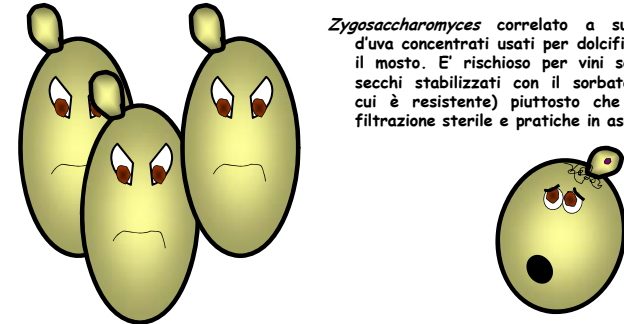
i cosiddetti "ceppi feroci" producono acido acetico molto rapidamente e interrompono la fermentazione alcolica (*S. cerevisiae* è inibito dall'1% di acido acetico)

Lactobacillus fructivorans and *L. hilgardii* sono molto resistenti all'etanolo e crescono anche in vini ad alta gradazione (fino al 20%) .

Le alterazioni che causano sono particolarmente minacciose per vini come il porto ma sono facilmente evitabili con l'aggiunta di SO_2

LIEVITI SELVAGGI

POSSONO ALTERARE LA VINIFICAZIONE COME IL BRASSAGGIO



Zygosaccharomyces correlato a succhi d'uva concentrati usati per dolcificare il mosto. E' rischioso per vini semi-seccchi stabilizzati con il sorbato (a cui è resistente) piuttosto che con filtrazione sterile e pratiche in asepsi

Brettanomyces e *Dekkera* sono considerati lieviti di deterioramento a causa dell'odore di stalla, associato alle loro fermentazioni. Questa alterazione si può verificare con qualsiasi vitigno o qualità di vino



MUFFE

organismi aerobi: difficilmente interferiscono con la vinificazione

Possono essere importanti se attaccano l'uva prima del raccolto, abbassando la qualità del mosto

rottura della buccia → contatto prematuro con il microbiota presente sull'acino → fermentazione alcolica incontrollata

La fermentazione prematura permette l' attacco dei microrganismi ossidanti, che provoca quantità inaccettabili di acido acetico, etil-acetato ed acetaldeide

Botrytis cinerea può essere causa dell'alterazione detta "casse" (browning): un colorito bruno che si previene pastorizzando prima di avviare la fermentazione

La "casse" può essere anche dovuta a un eccesso di sali ferrici e in questo caso si corregge con acido citrico

La stessa muffa ha un ruolo positivo in alcune fermentazioni particolari.

In questi casi i grappoli ammuffiti sono raccolti tardi e hanno un contenuto zuccherino molto alto.

La fermentazione di questi mosti dà origine ai vini " *Sauternes* " .



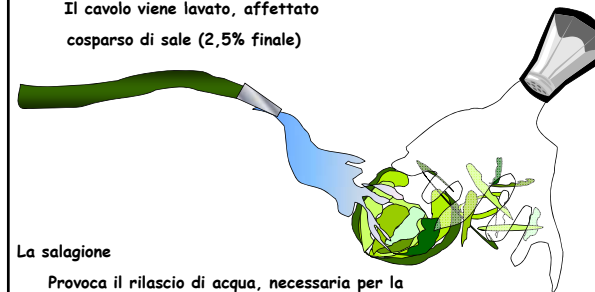
CRAUTI

A differenza di quanto succede per vino e birre, il processo per ottenere il sauerkraut è una fermentazione incontrollata (spontanea)

che sfrutta la presenza di microrganismi indigeni sulle foglie

Limitandosi a favorirne la crescita, in modo che siano essi stessi ad evitare lo sviluppo di specie diverse

Il cavolo viene lavato, affettato
cosperso di sale (2,5% finale)



La salagione

Provoca il rilascio di acqua, necessaria per la crescita dei microrganismi fermentanti

Limita la crescita di possibili specie concomitanti

La mistura viene messa al riparo dall'aria per favorire l'anaerobiosi
ma permettere la fuga dei gas prodotti durante la fermentazione

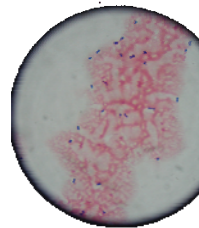
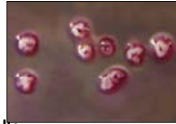
La fermentazione avviene attraverso una
naturale successione di specie

Regolata dal progressivo abbassarsi del pH

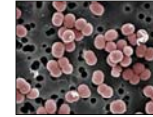
I primi ad intervenire sono batteri appartenenti al gruppo delle
enterobacteriaceae (*Klebsiella*, *Enterobacter*) aerobi ed anaerobi
facoltativi

la loro crescita consuma l'ossigeno
presente ed inizia ad abbassare il pH

creando condizioni favorevoli alla
crescita di *Leuconostoc* che
produce notevoli quantità di CO_2 ed
abbassa ulteriormente il pH



E le condizioni ambientali diventano ideali per
Lactobacillus (o *Pediococcus*)



Che soppiantano *Leuconostoc* e portano a termine il processo fermentativo

L'intero procedimento impiega circa
5 settimane

Dopo le quali il sauerkraut è pronto per
essere inscatolato e consumato

