

FERMENTATION:

- Organic compounds serve as both the electron donors and acceptors (mostly acceptors). C, H, and O must balance. Any energy for ATP formation must be derived from the oxidation of COH or C=O to COOH or CO₂
- The typical sugar fermentation pathways diverge at pyruvate (the Embden Meyerhof pathway end product).
- Incomplete breakdown of pyruvate to CO₂

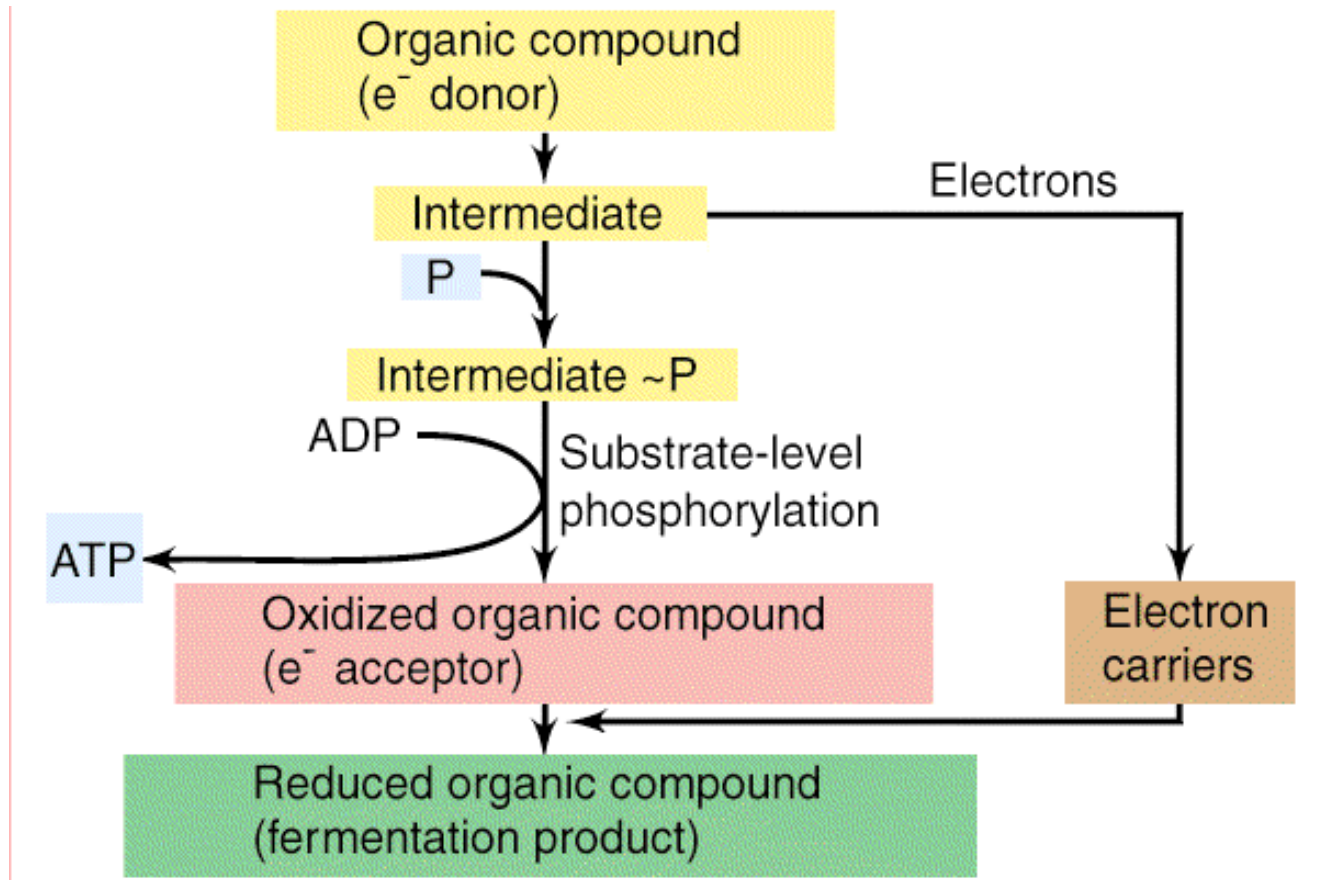
FERMENTATION:

- The most important function of these pathways is to regenerate NAD⁺ from the NADH formed during glycolysis under anaerobic conditions. Thus, oxidation of NADH, H accompanies reactions in which pyruvate or products derived from it are reduced.**
- In many pathways no additional ATP is generated.**
- Some pathways are aerogenic (gas producing); some anaerogenic ATP producing pathways (mixed acid) are favorable for organisms that grow in competitive environments where the energy source is limited.**

FERMENTATION:

- **Short fermentation pathways (ethanol, lactic acid) that do not yield additional ATP per hexose are favorable for fast growth if there is a rich C source**
- **Tests that detect fermentation pathway intermediates and products are used in the identification of bacteria (therefore of clinical relevance).**

Overview of fermentation



Fermentation Reactions

- Electrons from NADH must be passed on
- Homolactic fermentation (muscles; most lactic-acid bacteria)
 - Simplest fermentation
 - pyruvate is reduced to lactate
- Alcoholic (yeasts; uncommon in bacteria)
 - Pyruvate + NADH \rightarrow acetaldehyde + CO₂ + NADH \rightarrow ethanol + CO₂
- In any fermentation, products must balance reactants (C, H, O); $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 \times C_3H_6O_3$

Fermentations are named after major end products including:

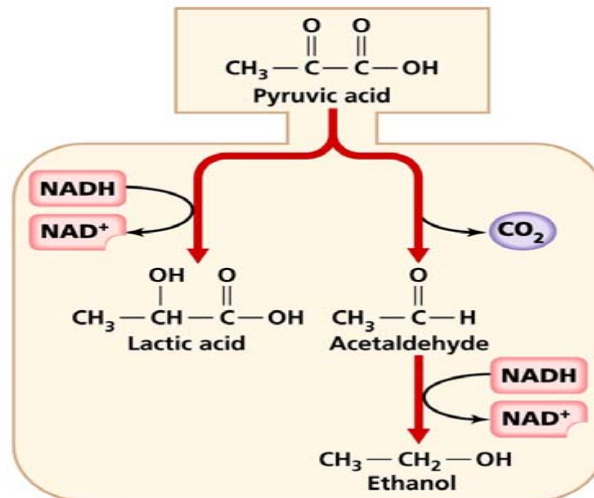
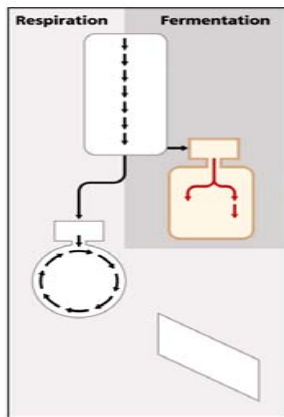
- **ethanol**
- **propionic acid**
- **acetic acid**
- **lactic acid**
- **mixed acid**
- **butanediol**
- **butyric/acetic acid shift to butanol/acetone**

Fermentation

Table 5.4 Comparison of Aerobic Respiration, Anaerobic Respiration, and Fermentation

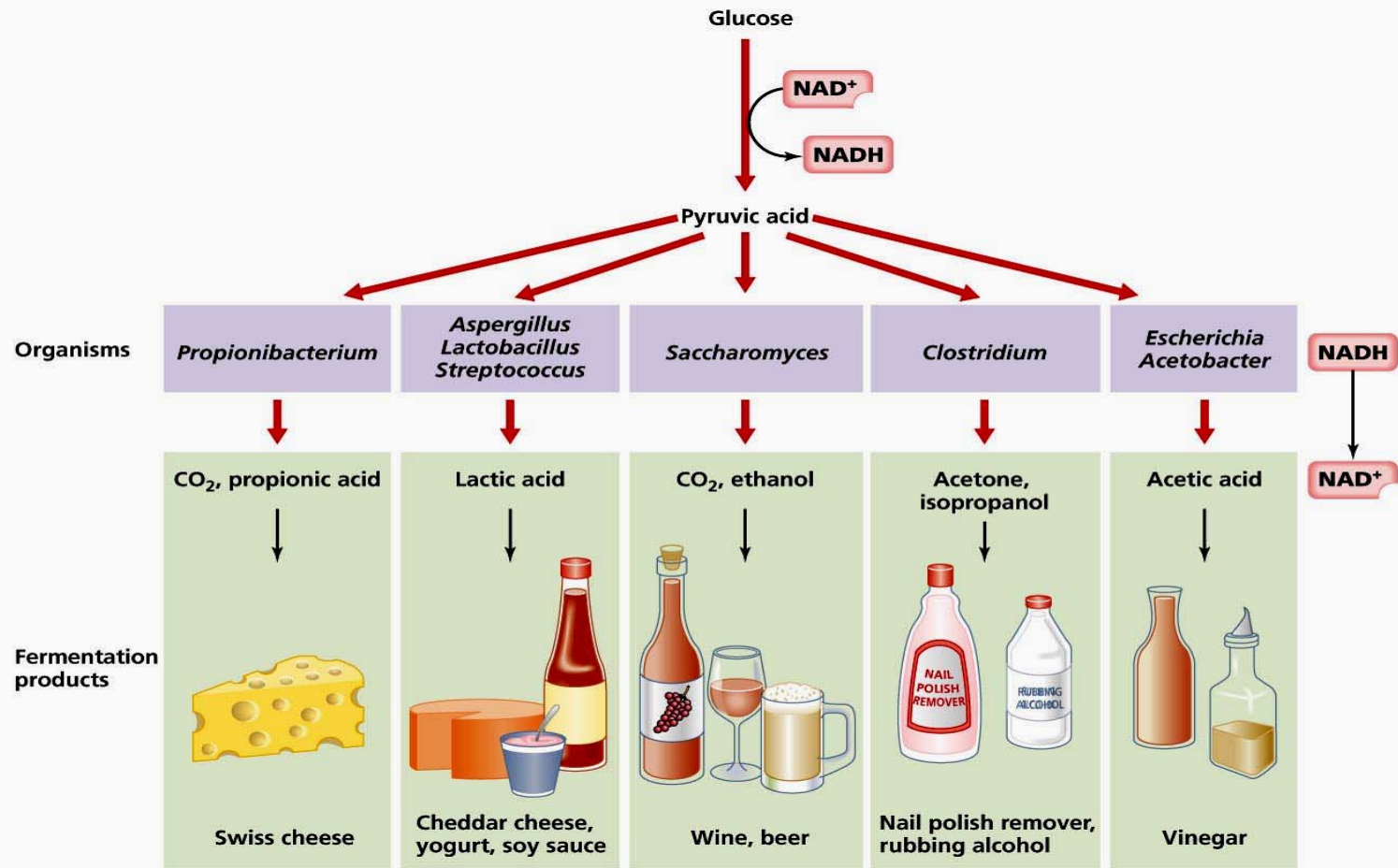
| | Aerobic Respiration | Anaerobic Respiration | Fermentation |
|-------------------------------------|-------------------------------|--|------------------------------|
| Oxygen required | Yes | No | No |
| Type of phosphorylation | Substrate-level and oxidative | Substrate-level and oxidative | Substrate-level |
| Final electron (hydrogen) acceptor | Oxygen | NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , or exogenous organic molecules | Endogenous organic molecules |
| Potential molecules of ATP produced | 36–38 | 2–36 | 2 |

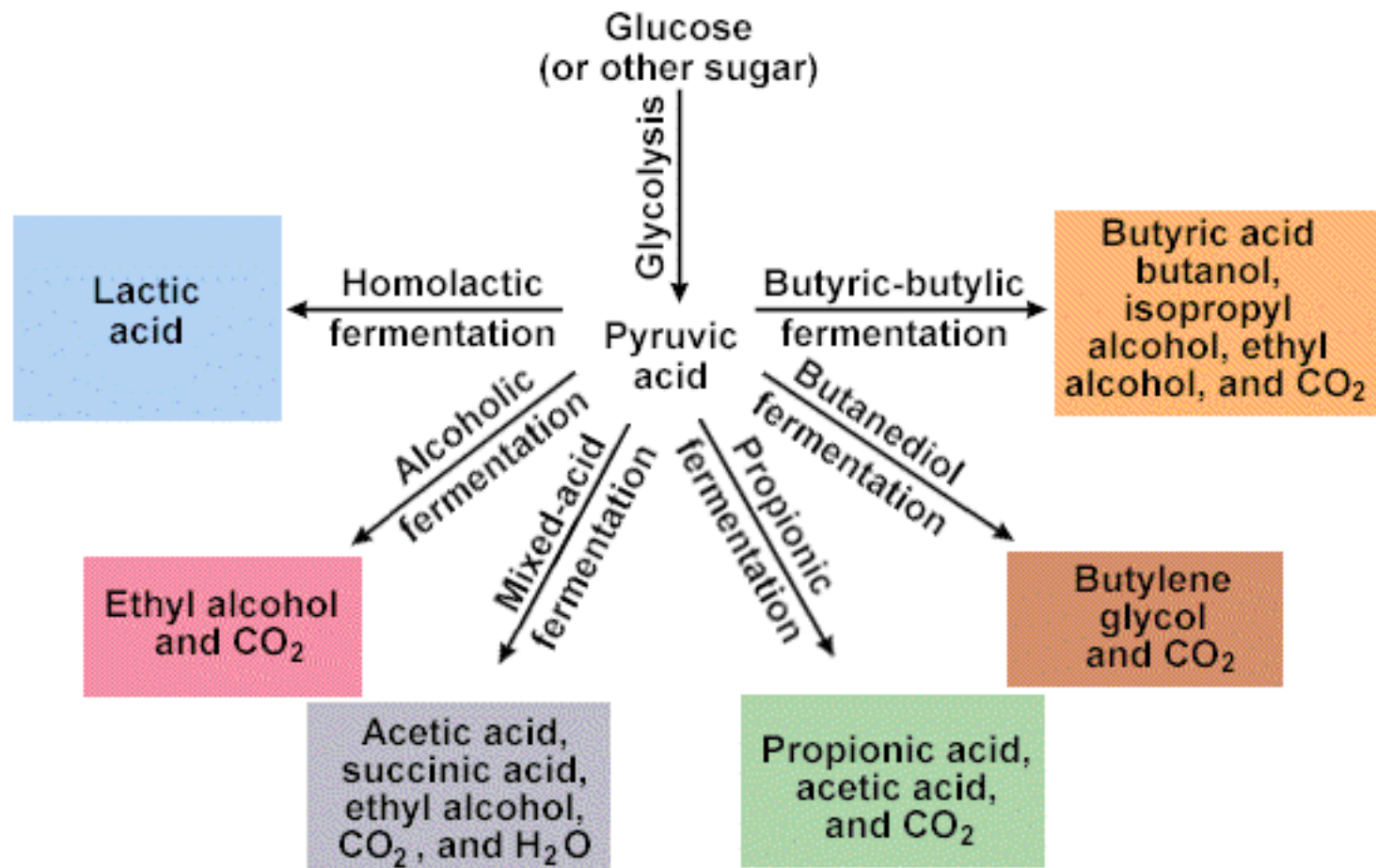
- Fermentation yields of ATP small relative to respiration
- Fermentation of sugars quickly uses up NAD^+ , which needs to be regenerated to keep up ATP production



Regenerating NAD⁺

Some fermentation products





**Produzione di metaboliti a due atomi di carbonio:
l'etanolo**

Produzione di metaboliti a due atomi di carbonio: l'etanolo

L'**etanolo**, oltre al suo **fondamentale ruolo nella produzione delle bevande alcoliche**, trova largo impiego nell'industria chimica come **solvente** e, soprattutto, come **precursore di tre altri importanti composti chimici; etilene, acetaldeide e acido acetico**. Da questi tre prodotti si dipartano filiere chimiche di produzione verso innumerevoli prodotti di largo consumo come **polimeri e copolimeri dell'etilene, prodotti aldolici, acetati di cellulosa** ecc.

“Bio-etanolo”: etanolo per l'autotrazione derivante dalla **conversione di zuccheri fermentabili**

Bioetanolo di prima generazione: quando gli zuccheri fermentabili sono derivati da saccarosio o amido

Bioetanolo di seconda generazione: quando ci si propone di ottenere questo importante e strategico prodotto da materiali cellulosici

Le caratteristiche di un biocatalizzatore ideale per la produzione di etanolo:

- o utilizzare un'ampia gamma di fonti di carbonio;
- o utilizzare fonti a basso costo e di facile reperibilità;
- o produrre etanolo con alte rese e alte produttività;
- o tollerare anche alte concentrazioni di etanolo;
- o tollerare le pressioni osmotiche causate dall'elevata concentrazione di substrato iniziale;
- o crescere a temperature relativamente elevate per ridurre il rischio di contaminazioni e per facilitare il recupero del prodotto;
- o flocculare facilmente per semplificare le operazioni di separazione della biomassa.

I biocatalizzatori impiegati hanno proprietà che talora deviano dalla idealità:

Saccharomyces cerevisiae
Zymomonas mobilis
Clostridium thermocellum

Tabella 7.1 Fonti di carbonio utilizzate da diversi microrganismi.

| Microorganismi | Fonti di carbonio |
|--|--|
| Batteri <i>Clostridium spp.</i> | Glucosio, xilosio, saccarosio, cellobiosio, cellulosa, amido |
| <i>Zymomonas mobilis</i> | Glucosio, fruttosio, saccarosio |
| Lieviti <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Glucosio, fruttosio, galattosio, maltosio, saccarosio, maltotriosi |
| <i>Candida tropicalis</i> | Glucosio, xilosio, xiluloso |
| <i>Pichia pastoris</i> | Glucosio, xilosio, xilani |

Le fonti di carbonio utilizzate

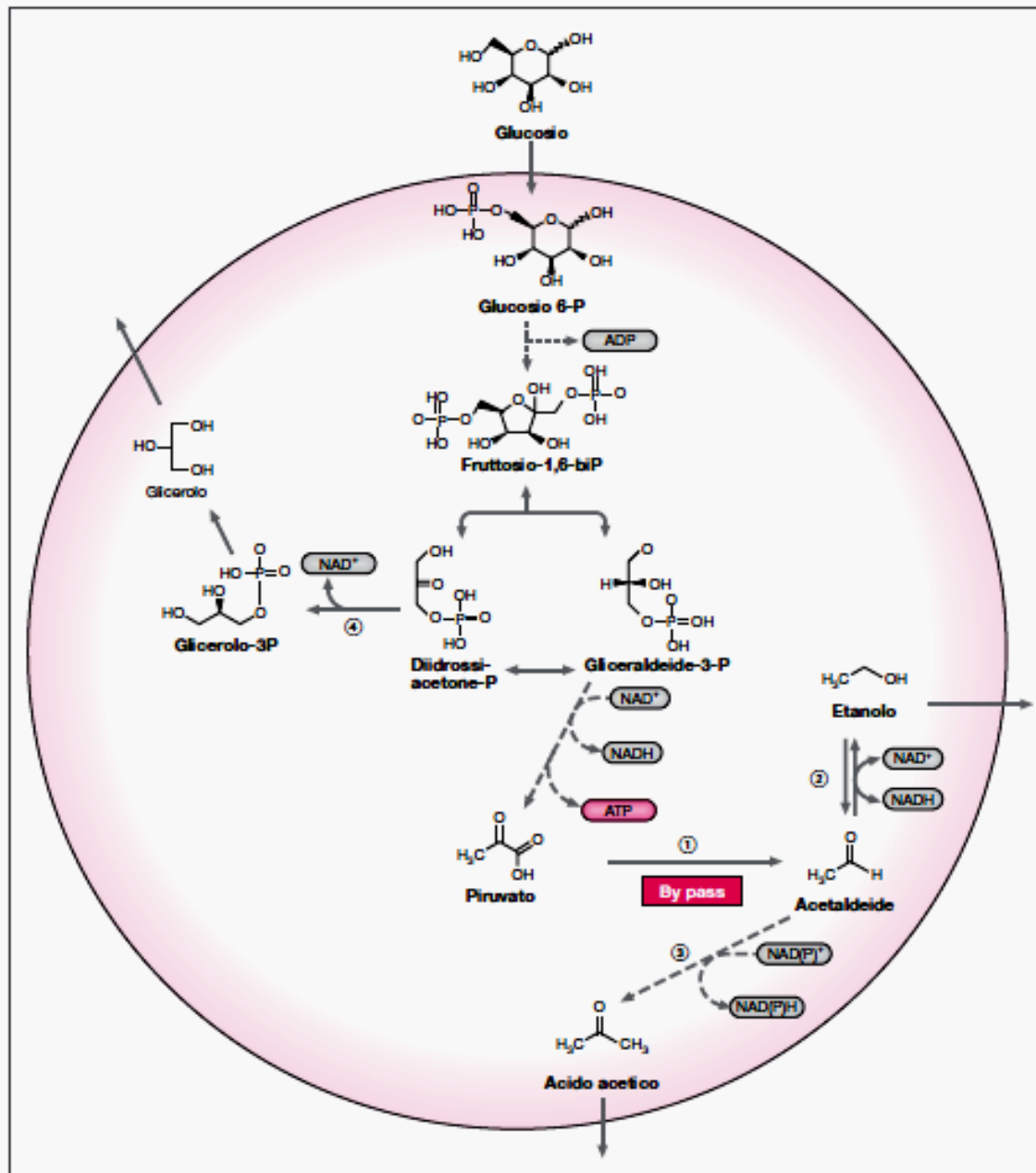
Economiche e di facile reperibilità

S. cerevisiae e ***Z. mobilis*** sono in grado di utilizzare **saccarosio** come fonte di carbonio, dal momento che entrambi i microrganismi possiedono l'**invertasi**

- ❑ **succhi di canna da zucchero** (utilizzati in Brasile) o di **barbabietola** (utilizzati in USA e in Europa) - contenuto di saccarosio è circa il 20% in peso della materia prima.
- ❑ **melassi**, il residuo di scarto della produzione dello zucchero da tavola.
- ❑ **amido e cellulosa**, a condizione che subiscano un trattamento chimico-enzimatico in modo da liberare le componenti monosaccaridiche dai rispettivi polimeri

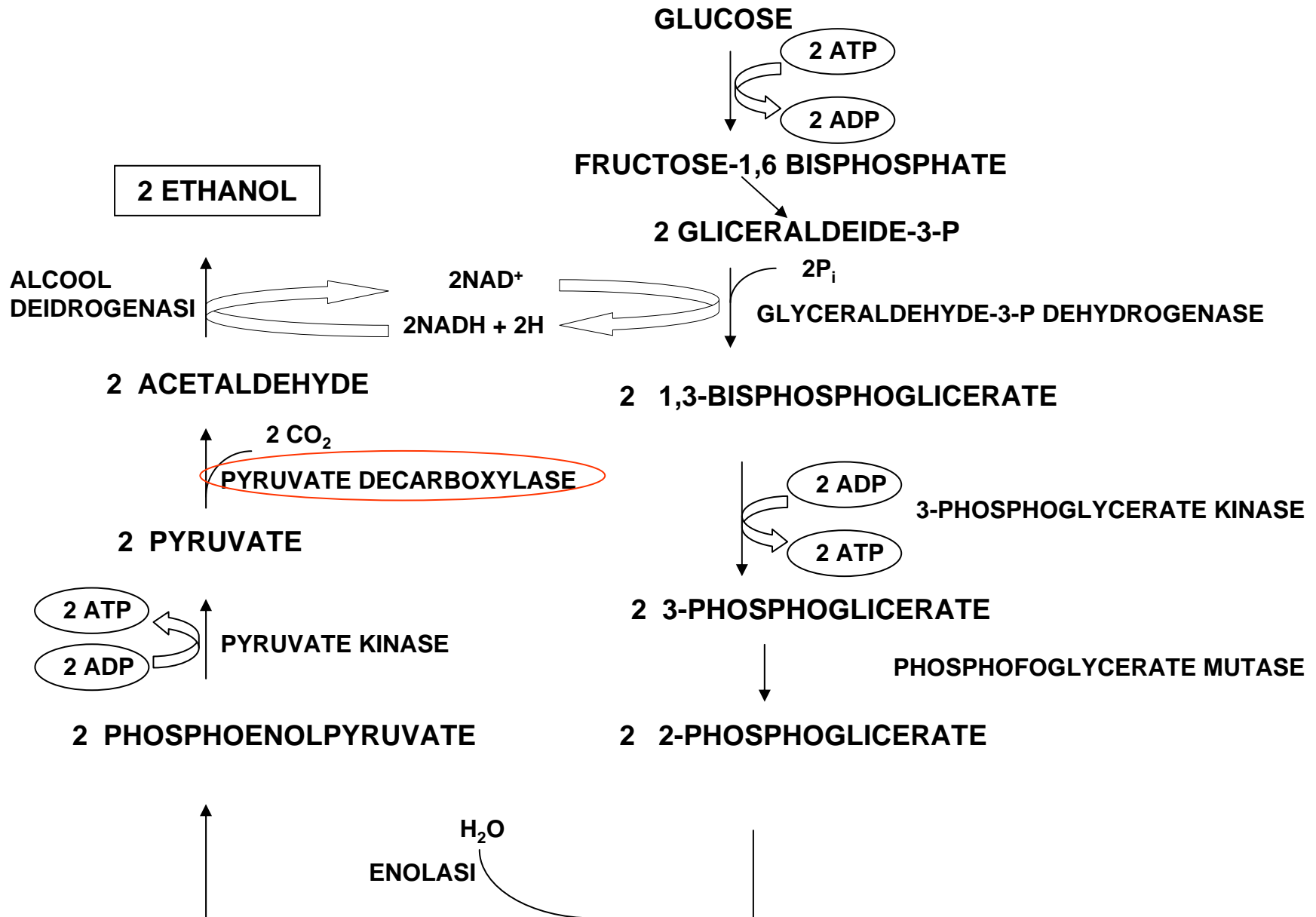
Clostridium thermocellum è in grado di degradare con estrema efficienza **cellulosa ed emicellulosa**, in quanto è in grado di secernere più di 20 diverse cellulasi ed emicellulasi, organizzate in un "cellulosoma".

Biosintesi dell'etanolo nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*.



Rappresentazione schematica dei passaggi chiave nella biosintesi dell'etanolo nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Gli enzimi implicati nel processo metabolico rappresentato sono indicati come segue: 1: piruvato decarbossilasi; 2: alcol deidrogenasi; 3: acetaldeide deidrogenasi; 4: glicerolo 3-fosfato deidrogenasi.

Fermentazione alcolica in lieviti

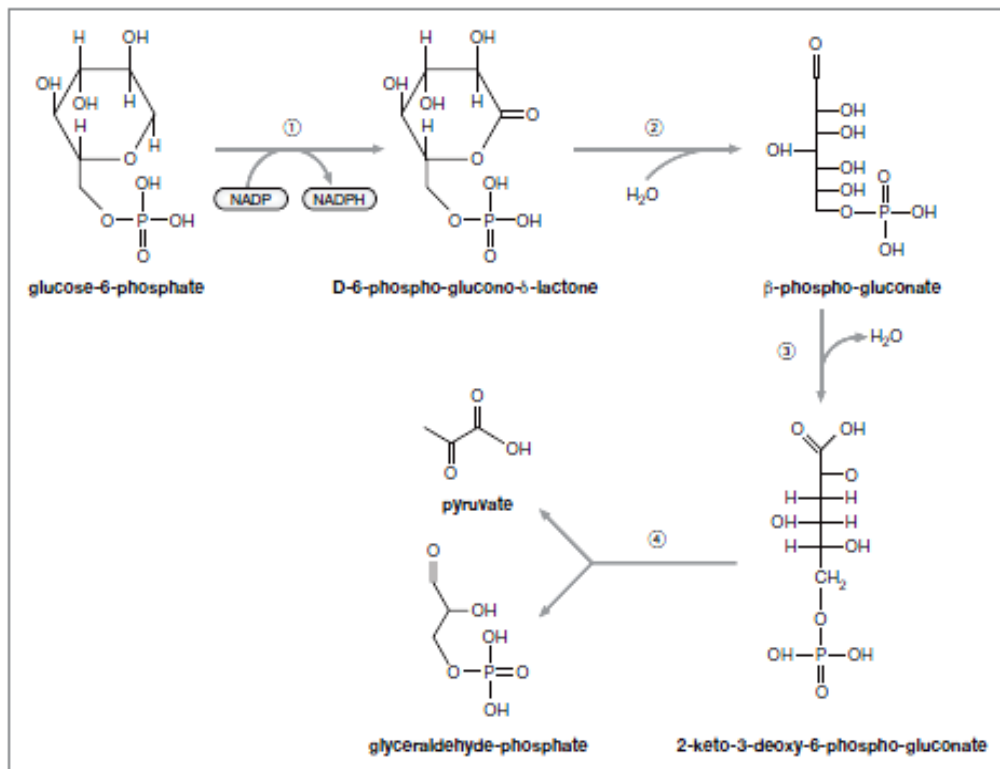


Biosintesi dell'etanolo nel batterio Gram- *Zymomonas mobilis*

Anaerobio facoltativo

Non possiede alcun gene codificante la fosfofruttochinasi! NO GLICOLISI (EMP)

Glucosio e fruttosio sono metabolizzati attraverso la via di **Entner e Doudoroff (ED)**



Via di Entner-Doudoroff.

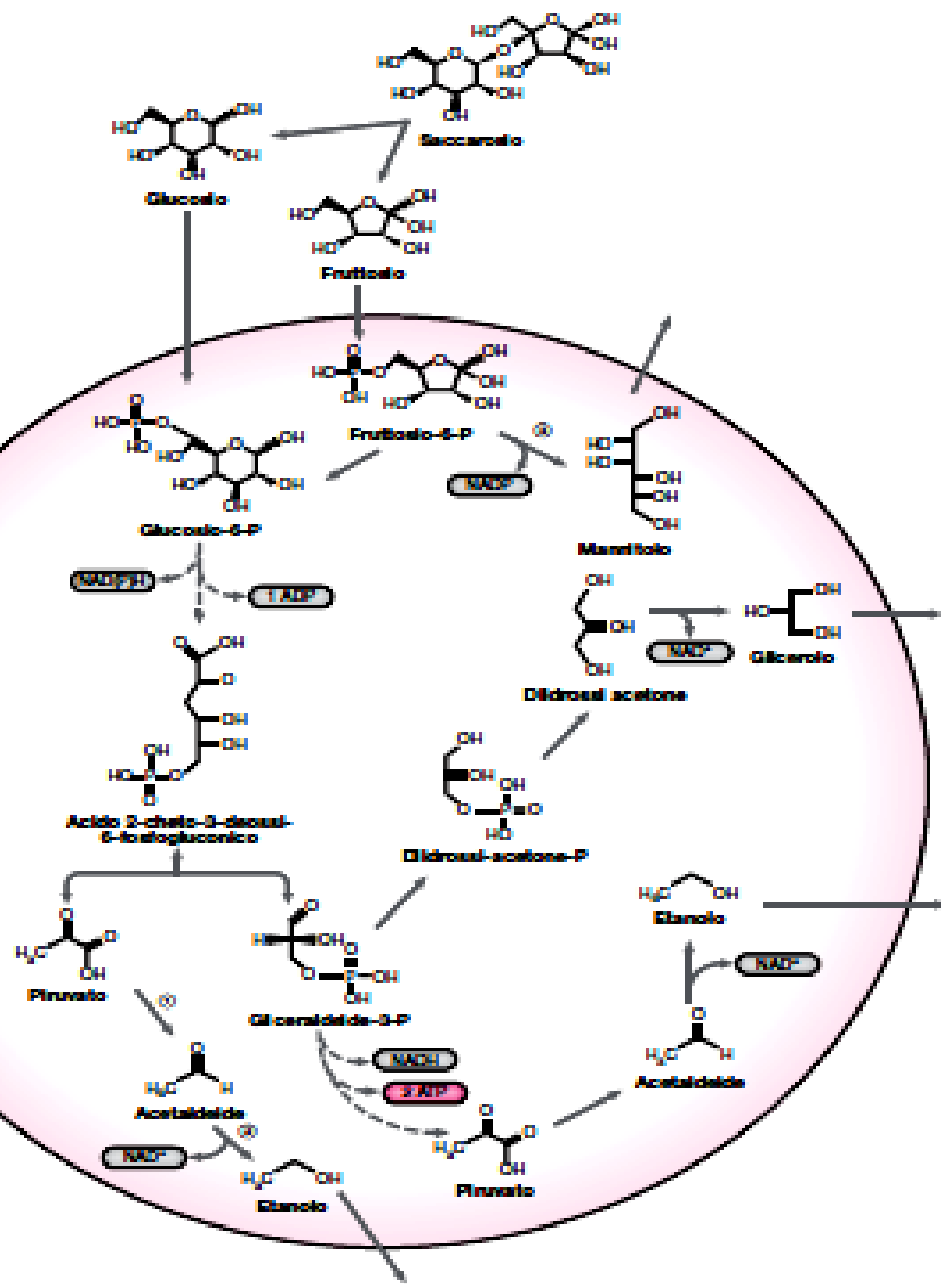
Riproduzione schematica dei passaggi chiave della via di Entner-Doudoroff in *Zymomonas mobilis*. Gli enzimi interessati nel processo metabolico rappresentato sono indicati come segue 1: glucosio 6-fosfato deidrogenasi; 2: 6-fosfogluconattonasi; 3: fosfogluconato deidratasi; 4: 2-cheto-3 deosii 6-fosfogluconato aldolasi.

EMP: Glucosio → (fruttosio 1,6 bisP) → diidrossiacetone P + gliceraldeide 3P → 2 ATP prodotte

ED: Glucosio → (2-cheto-3-deossi-6P gluconato) → piruvato + gliceraldeide 3P → 1 ATP prodotta

Biosintesi dell'etanolo nel batterio *Zymomonas mobilis*.

Raffigurazione schematica della biosintesi dell'etanolo in *Zymomonas mobilis*. Gli enzimi coinvolti nel processo metabolico mostrato sono indicati come segue 1: piruvato decarbossilasi; 2: alcol deidrogenasi; 3: mannitolo deidrogenasi.



I processi industriali di produzione dell'etanolo

Lieviti in *fed-batch*:

Fase 1: produzione della biomassa in *fed-batch* ed in spinta aerobiosi

Fase 2: inoculo del fermentatore da produzione (20% volume finale)

T processo **30-35°C**

pH processo tra **4,5 e 5,5** (mai sotto 4,0!)

riempimento in 4-6 ore, quindi conversione in etanolo. Inibizione da prodotto

Processo Mellè-Boinot (affermato in Europa per la conversione di melassi)

Riciclo della biomassa microbica (fino al 80%) nel processo successivo, con diminuzione dei tempi di produzione ed aumento dei substrati disponibili per la conversione in etanolo

Processi in continuo

Impiego di **fermentatori in continuo in serie**

Processo Biostil, processo **in continuo con riciclo di biomassa** che prevede la **distillazione dell'etanolo durante il processo**. La concentrazione di etanolo nel fermentatore è sempre inferiore a quella inibente, per cui la fermentazione procede sempre alla massima velocità.

**Produzione di metaboliti a tre atomi di carbonio:
l'acido lattico**

Produzione di metaboliti a tre atomi di carbonio: l'acido lattico

L'**acido lattico**, isolato come miscela racemica per la prima volta nel 1798 dal latte acido, è stato il primo acido organico prodotto industrialmente per fermentazione. Il mercato mondiale è in rapida crescita (circa 250 000 tonnellate per anno) ed è stimato valere annualmente parecchie centinaia di milioni di dollari

Impieghi:

- industria alimentare
- industria farmaceutica e fitosanitaria
- industria della chimica fine (quale sintone chirale)
- precursore di omo- e di co-polimeri biodegradabili (PLA)

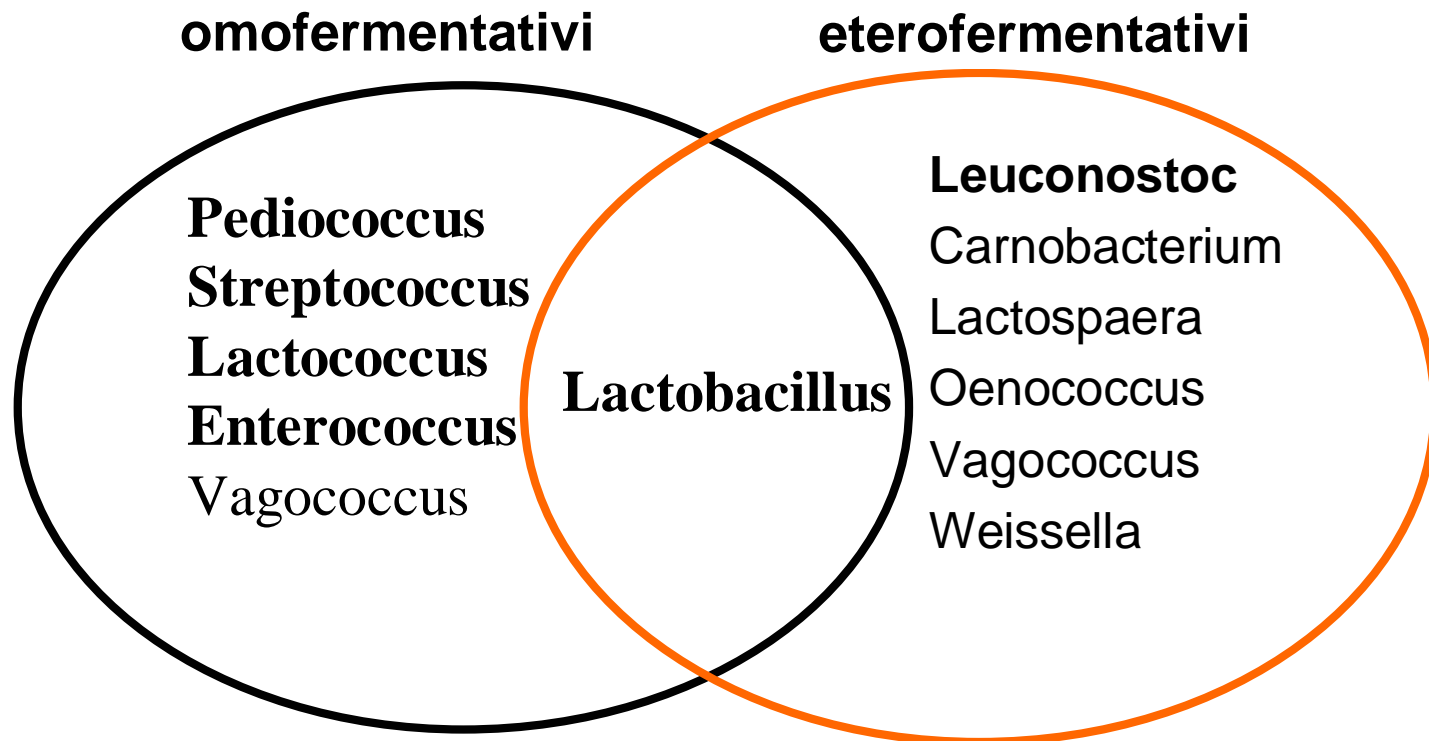
L'**acido polilattico** (PLA) è un poliestere alifatico termoplastico e biodegradabile che si può sintetizzare a partire dal monomero dell'acido lattico. Il PLA è biodegradabile, estremamente resistente ed è impiegato nei settori più diversi: l'imbottigliamento delle acque minerali; nel settore tessile o nel settore del *catering*, con, piatti, bicchieri e posateria monouso dal momento che le prestazioni meccaniche e di resistenza agli agenti termici (derivanti, nell'uso, dagli sforzi applicati e dai repentini sbalzi di temperatura dovuti al contatto con cibi/bevande molto freddi o molto caldi) dei prodotti in biopolimero sono assolutamente paragonabili a quelle delle plastiche tradizionali.

I biocatalizzatori produttori di acido lattico: i batteri lattici

Gram-positivi

Anaerobi aerotolleranti acidofili, metabolizzano il glucosio solo per via fermentativa
Producono la maggior parte dell'ATP per **fosforilazione a livello del substrato**

Si distinguono in **batteri omolattici** (se il glucosio è convertito unicamente in acido lattico) ed **eterolattici** (producono anche altri prodotti)



Le basi metaboliche della produzione di acido lattico

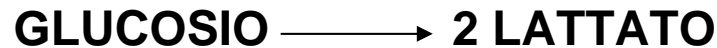
I batteri lattici eterofermentativi utilizzano la via dei pentoso-fosfati

✓ La via eterofermentativa



I batteri lattici omofermentativi convertono il glucosio in piruvato attraverso la Embden-Meyerhoff-Parnas.

✓ La via omofermentativa

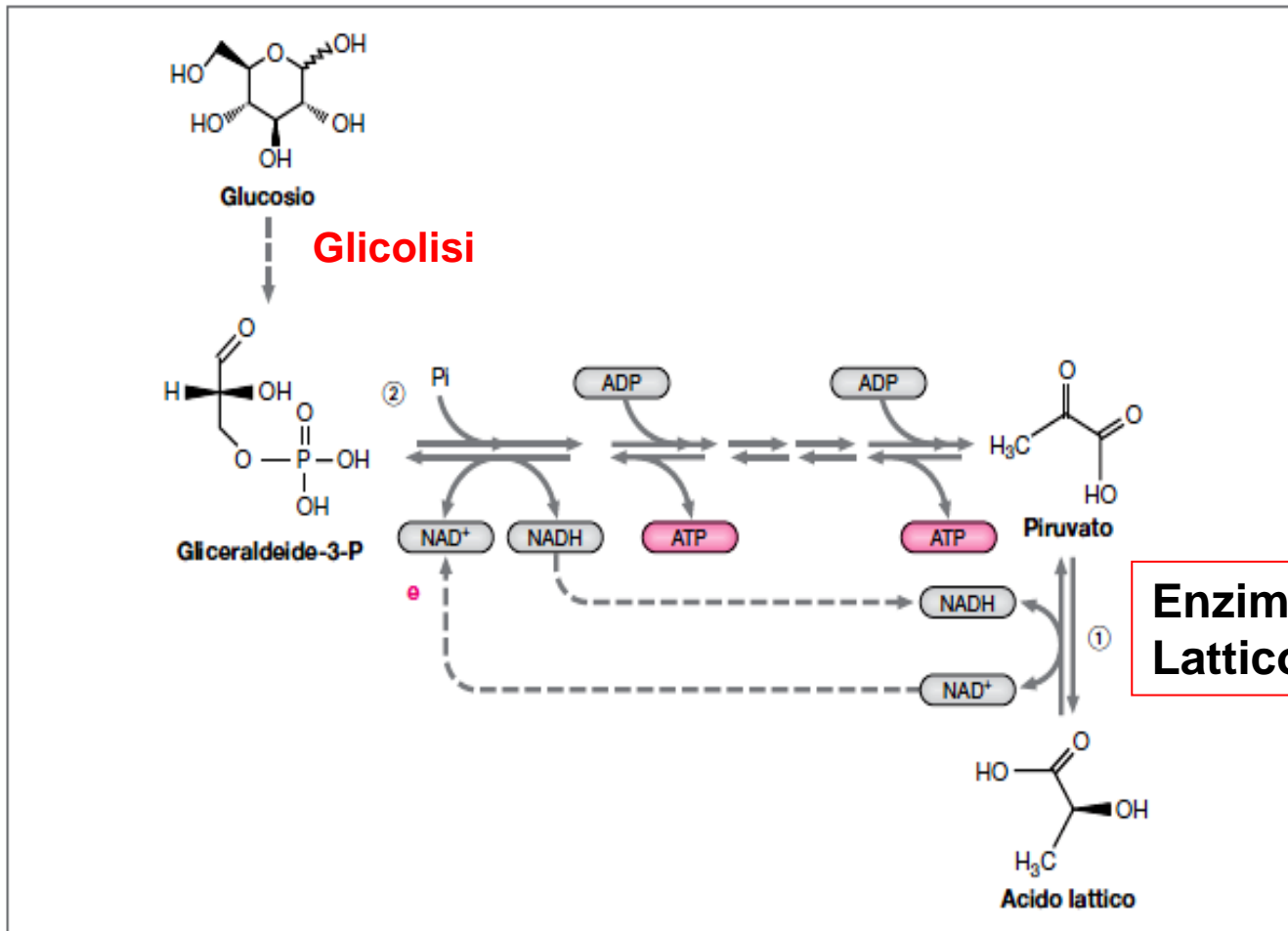


Alcuni batteri lattici, i Bifidobatteri, utilizzano una via specializzata detta *Bifidus pathway* o ciclo del fruttosio-6-fosfato

✓ THE BIFIDUM PATHWAY



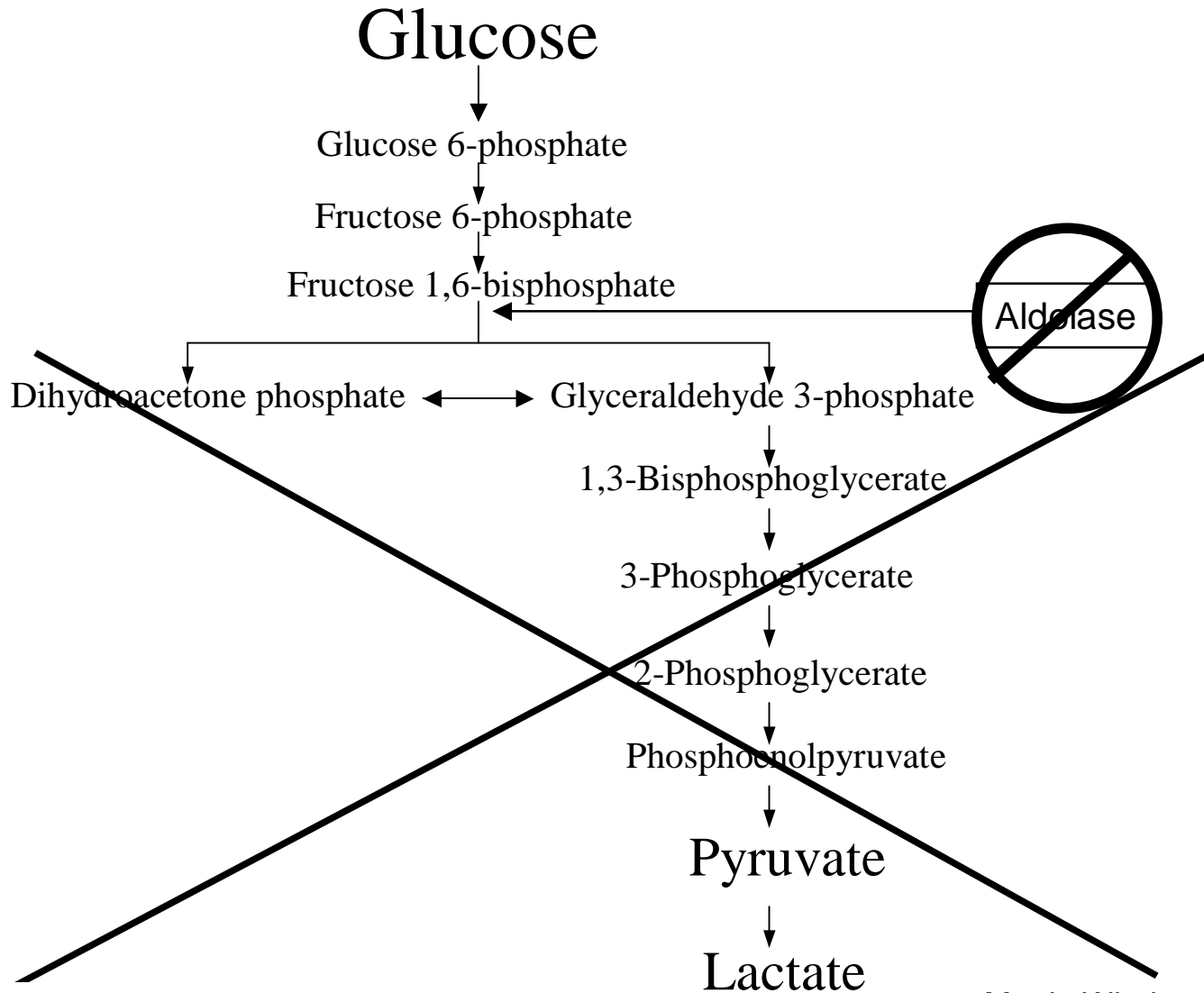
Metabolismo dell'acido lattico nei batteri omolattici.



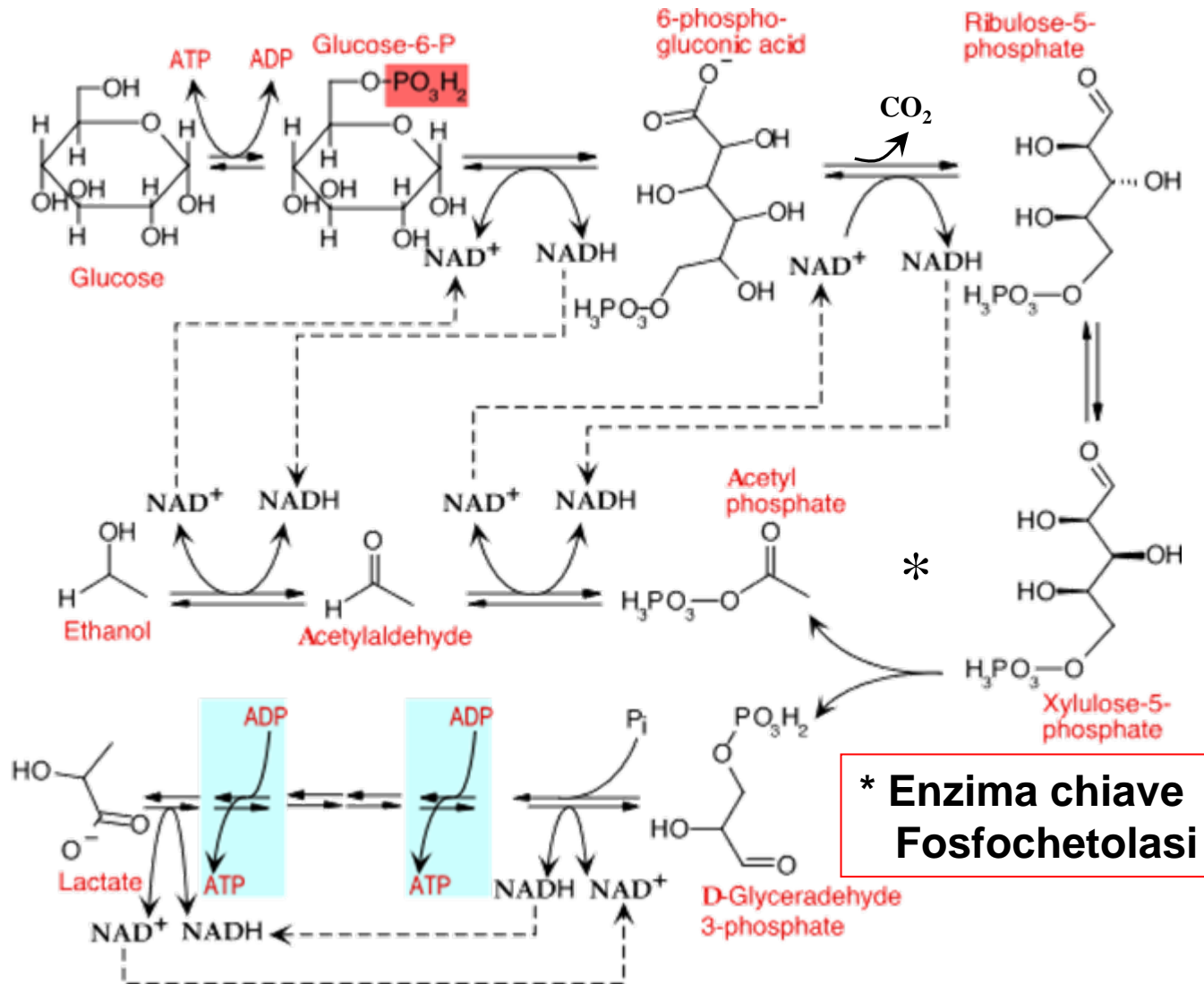
Rappresentazione schematica dei passaggi chiave nella biosintesi dell'acido lattico nei batteri omolattici, con il numero 1 è indicata la lattico deidrogenasi. La via metabolica iniziale è la glicolisi

Metabolismo dell'acido lattico nei batteri eterolattici.

Non posseggono il gene codificante l'aldolasi, per cui hanno evoluto vie metaboliche alternative

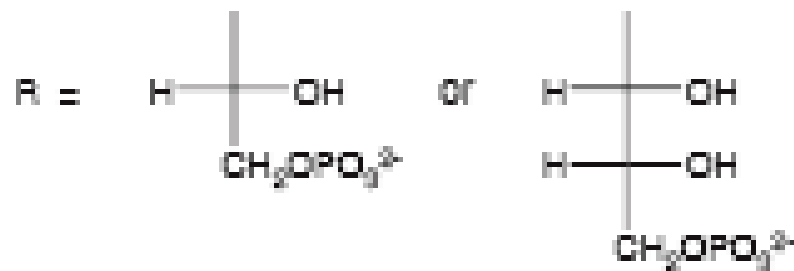
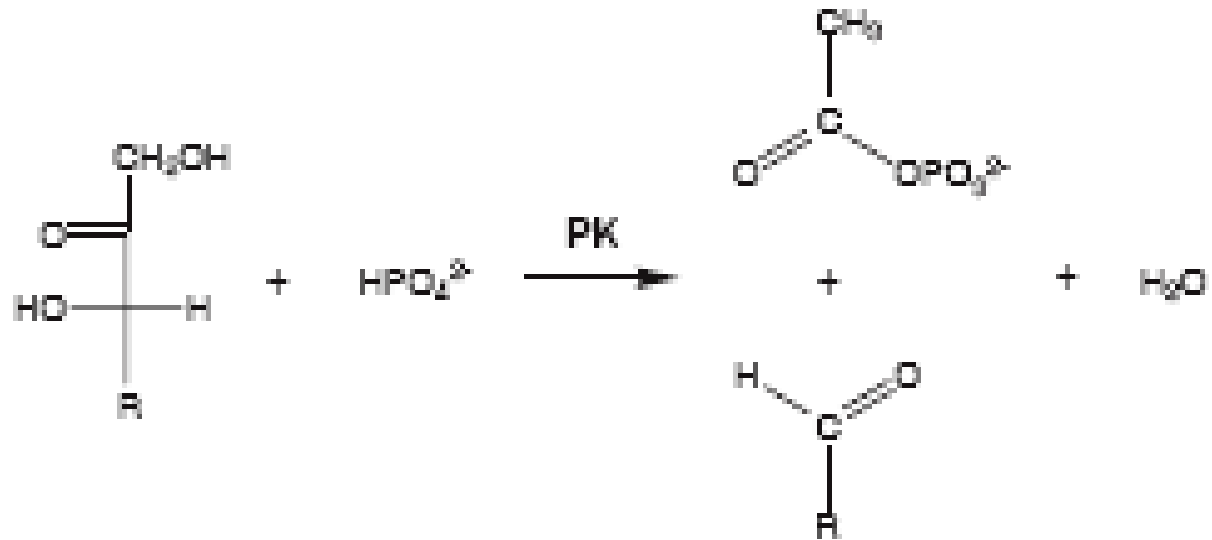


Metabolismo dell'acido lattico nei batteri eterolattici.

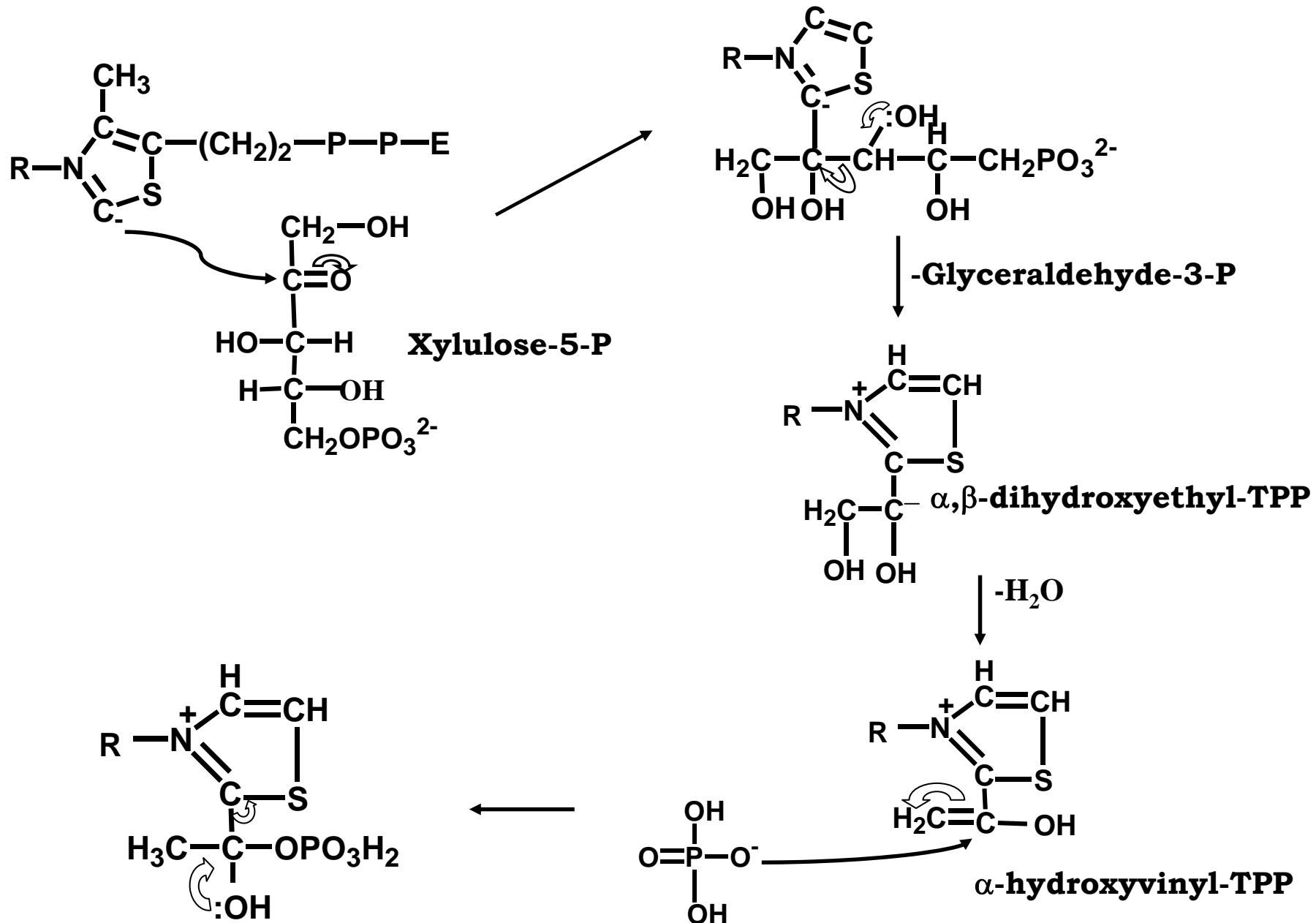


In questa via metabolica la parte superiore della glicolisi non viene utilizzata. Si noti il riciclo di NADH e la bassa resa energetica, dal momento che è generato una sola molecola di ATP per molecola di glucosio fermentata.

La reazione catalizzata dalla fosfochetolasi.

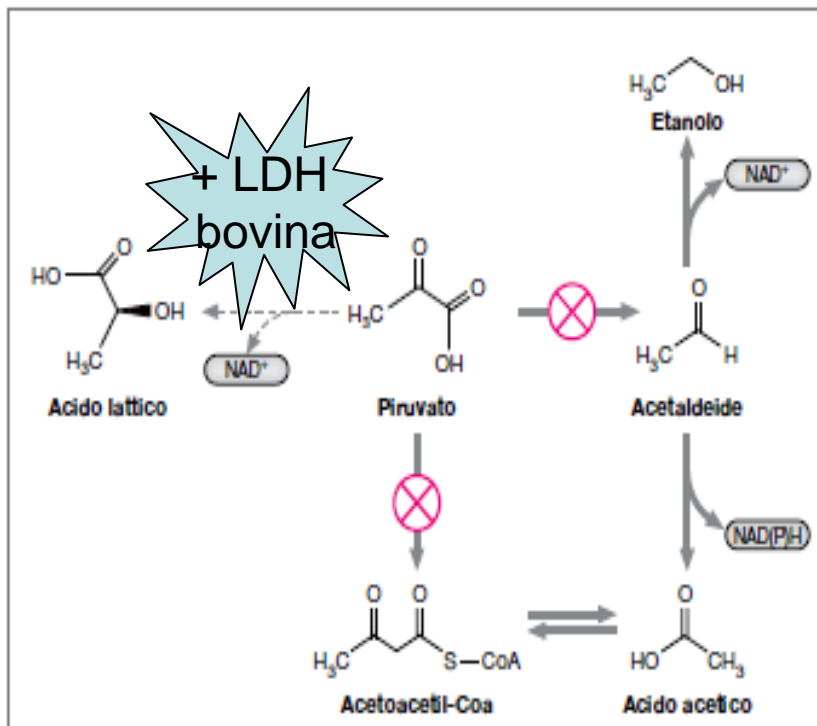


Meccanismo proposto per la reazione della fosfochetolasi.



Creazione di lieviti ingegnerizzati per la produzione di acido lattico

Per limitare il problema associato alla sensibilità agli acidi dei ceppi produttori di acido lattico, è stato ipotizzato l'utilizzo di un microrganismo capace di crescere e di rimanere attivo a bassi valori di pH. Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, organismo non patogeno, ampiamente utilizzato per applicazioni biotecnologiche, cresce e rimane metabolicamente attivo anche a bassi valori di pH (3- 3,5), inoltre sono consolidate le metodiche che consentono di modificare i suoi cammini metabolici.



In particolare, è stato creato un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* capace di esprimere il gene eterologo LDHA, codificante l'enzima lattico deidrogenasi bovina, e di convertire il piruvato ad acido L-lattico. Per rendere conveniente il processo è stato necessario studiare, sviluppare e utilizzare lieviti ospite **mancanti** dell'attività **piruvato deidrogenasica e/o piruvato decarbossilasica**.

Il processo industriale di produzione dell'acido lattico

Due aspetti critici del processo:

- ❑ la crescita dei ceppi produttori è inibita dalla diminuzione del pH (accumulo lattato)
neutralizzazione per aggiunta di NaOH, **CaCO₃**, NH₄OH
recupero del lattato come sale, ulteriori costi per il downstream!
- ❑ necessità di produrre una unica forma enantiomerica
genesì di mutanti specifici (ingegneria metabolica) di *L.lactis* capaci di raggiungere rese di conversione fino al 95% del teorico

Processi in *batch*

- ❑ Batteri lattici (*Lactococcus lactis*)
- ❑ Fermentatori da 100 m³
- ❑ Fonti di carbonio molto concentrate (120-180 g l⁻¹)
- ❑ Specifiche richieste nutritive (vitamine gruppo B ed alcuni aa)
- ❑ T=45°C e pH= 5,5 – 6,0
- ❑ Rese di conversione tra 85 e 95% in 4-6 giorni