

Relazione Scientifica Short-term mobility (2010)

Proponente: Dr. Annarita Poli

Beneficiario: Prof. Ebru Toksoy Oner

ICB - CNR - ICB		
Tit.	Ci.	F.
N. 0002902		03/11/2010



Titolo Programma: “Sviluppo di nuovi microrganismi di interesse industriale”

Periodo Soggiorno: 04 Ottobre-22 Ottobre 2010

Sede Soggiorno: Istituto di Chimica Biomolecolare di Pozzuoli

La Prof. Ebru Toksoy Oner, professore associato del Dipartimento di Bioingegneria della Facoltà di Ingegneria della Marmara University (Istanbul, Turchia), durante la sua visita all'ICB del CNR di Pozzuoli dal 04/10/2010 al 22/10/2010, ha sviluppato un progetto dal titolo 'Sviluppo di nuovi microrganismi di interesse industriale'.

In particolare, la Prof. Toksoy Oner, grazie alla sua esperienza nella Chimica delle Fermentazioni e nello sviluppo di processi per la produzione di biomolecole dotate di potenziale applicazione industriale, ha valutato le condizioni ottimali di crescita e produzione di esopolisaccaridi (EPS) da batteri estremofili, denominati alofili perché in grado di crescere in ambienti contraddistinti da un'elevata concentrazione salina, appartenenti al genere *Halomonas*, isolati da un'area con elevata concentrazione salina, Çamalti Saltern Area, nei pressi di Izmir, Turchia.

In particolare, un totale di dieci microrganismi alofili sono stati esaminati per la loro capacità di produrre EPS e lo studio è stato approfondito sul miglior ceppo produttore, denominato *Halomonas* sp. AAD6, andando a valutare le diverse fonti di carbonio presenti nel terreno di crescita a cui si è avuta una maggiore produzione di EPS. La Prof. Toksoy Oner ha valutato le condizioni di crescita idonee di questo microrganismo, prendendo in considerazione sia fattori chimici, quali la natura e le concentrazioni dei substrati-nutrienti, il pH del terreno di crescita, la concentrazione di ossigeno disciolto, che di fattori fisici quali la miscelazione, la dissipazione di energia, la temperatura, ecc. L'obiettivo finale di tale studio è stato l'ottimizzazione del processo fermentativo di *Halomonas* sp. AAD6, allo scopo di progettare linee di produzione ad alte rese di esopolisaccaride.

Crescita dei batteri alofili appartenenti al genere *Halomonas*

La crescita dei vari ceppi di *Halomonas* è stata valutata su terreno di crescita (Terreno A), contenente (g/L): 0.5 yeast extract (Oxoid), 0.0002 ZnSO₄·7H₂O (Riedel de Haen), 0.05 CaCl₂

(Applichem), 0.6 (NH₄)₂SO₄ (Riedel de Haen), 0.002 CuSO₄·5H₂O (Carlo Erba), 3.18 KH₂PO₄ (Carlo Erba), 0.0002 MnSO₄·4H₂O (Riedel de Haen), 5.2 K₂HPO₄ (Carlo Erba), 0.0002 CoCl₂·6H₂O (Riedel de Haen), 0.3 MgSO₄·7H₂O (Riedel de Haen), 0.0006 FeSO₄·7H₂O (Carlo Erba) e 100 NaCl (Riedel de Haen).

Inoltre, è stato valutato il substrato (la fonte di carbonio) in grado di fornire la più alta produzione di biomassa e di esopolisaccaride in terreno complesso (Terreno B), per il ceppo denominato *Halomonas* ADD6.

La composizione del terreno B è (g/L): 7.0 K₂HPO₄ (Carlo Erba), 2.0 KH₂PO₄ (Carlo Erba), 0.1 MgSO₄·7H₂O (Riedel de Haen), 1.0 (NH₄)₂SO₄ (Riedel de Haen), 0.5 Peptone (Oxoid), 100 NaCl (Riedel de Haen) e 10 di una delle seguenti fonti di carbonio: glucosio (Sigma), lattosio (JT Baker), saccarosio (JT Baker), fruttosio (Sigma), galattosio (Sigma), maltosio (Sigma), xilosio (Applichem), raffiniosio (Sigma), arabinosio (Sigma), mannosio (Sigma), ramnosio (Carlo Erba), acetato (JT Baker), glicerolo (JT Baker) e trisodio citrato (JT Baker).

Prove di crescita e produzione di EPS

La crescita dei microrganismi alofili è stata condotta in beute da 500 ml (contenente 50 ml di terreno) poste in incubatore dotato di movimento oscillatorio orizzontale settato ad una velocità di agitazione di 180 rpm e ad una temperatura di 37 °C in modo da valutare l'influenza di diversi parametri fisici sulla crescita e produzione di esopolisaccaride.

Inoltre, le coltivazioni del ceppo *Halomonas* AAD6 sono state eseguite in bioreattore, in un fermentatore (BIOSTAT Q, 5 L) dotato di controllo computerizzato del pH e della temperatura. Il volume utilizzato è stato di 500 ml e i parametri di temperatura e pH sono stati settati a 37°C e pH 7. L'aerazione (0.1 ml per volume di liquido al minuto) e l'agitazione (200 rpm) sono state mantenute costanti per tutta la durata della crescita batterica.

La crescita cellulare è stata seguita misurando la densità ottica, alla lunghezza d'onda di 660 nm mediante spettrofotometro (Varian DMS 90), di aliquote del terreno di crescita prelevate a vari tempi.

L'EPS prodotto è stato recuperato dopo aver separato le cellule dal liquido di crescita. In breve, le cellule sono state allontanate mediante centrifugazione a 8.000 rpm per 15 min. Il supernatante è stato trattato, goccia a goccia, sotto lenta agitazione a freddo con etanolo concentrato al 96% in un rapporto 1:1 (v/v). La precipitazione dell'EPS è stata completata alla temperatura di -18°C per una notte. Il precipitato, recuperato mediante centrifugazione a 10.000 rpm per 40 minuti, è stato sciolto in acqua distillata calda in un volume pari ad 1/10 del volume del supernatante iniziale.

La soluzione acquosa contenente il precipitato è stata dializzata con membrana Spectra/Por MWCO (Molecular Weight Cut Off 6.00-8.00 Da) contro acqua distillata per 72 ore. Tale soluzione è stata successivamente congelata e liofilizzata. Il prodotto ottenuto viene indicato come EPS grezzo.

Analisi della composizione monosaccaridica degli EPS

I campioni liofilici di EPS grezzo sono stati idrolizzati con acido trifluoroacetico (Carlo Erba) 0,5 M, sciogliendo 4 mg di campione in 1 ml di acido, a 120°C per 1,5 ore in tubi di vetro pyrex. L'acido è stato rimosso in corrente di azoto e l'acqua residua è stata allontanata mediante metanolo, anch'esso successivamente rimosso in corrente di azoto. Il pellet è stato dissolto in 0.1 ml H₂O distillata, trasferito in tubi Eppendorf, centrifugato a

12.000 rpm per 10 minuti e il supernatante, conservato a -20°C, è stato analizzato per la determinazione della composizione monosaccaridica.

L'identificazione dei monosaccaridi presenti nell'EPS idrolizzato è stata effettuata mediante cromatografia a scambio anionico ad alta pressione con sistema rivelatore dotato di cella amperometrica (HPAE-PAD, Dionex) fornito di colonna Carbo-Pac PA-1 (Chemtek, $\phi=4$ mm, h=252 mm).

I campioni idrolizzati di EPS sono stati saggati in volume di 5 μ l ed eluiti isocraticamente con soluzione NaOH 16 mM. Il cromatogramma è stato rilevato in tempo reale da un sistema computerizzato (Baseline Software 810 Dynamic Solution, Millipore).

Risultati

Produzione di biomassa ed esopolisaccaride dai ceppi alofili appartenenti al genere *Halomonas*.

a) In fiasche

La capacità dei ceppi alofili appartenenti al genere *Halomonas* di crescere sul terreno A è stata valutata attraverso il prelievo di aliquote dalle colture a vari tempi (24, 48 e 72 ore) leggendo allo spettrofotometro la densità ottica (O.D.) alla lunghezza d'onda di 660 nm. Tali microrganismi hanno dimostrato una buona capacità di replicazione cellulare nel terreno A nelle condizioni di crescita stabilite (Fig.1).

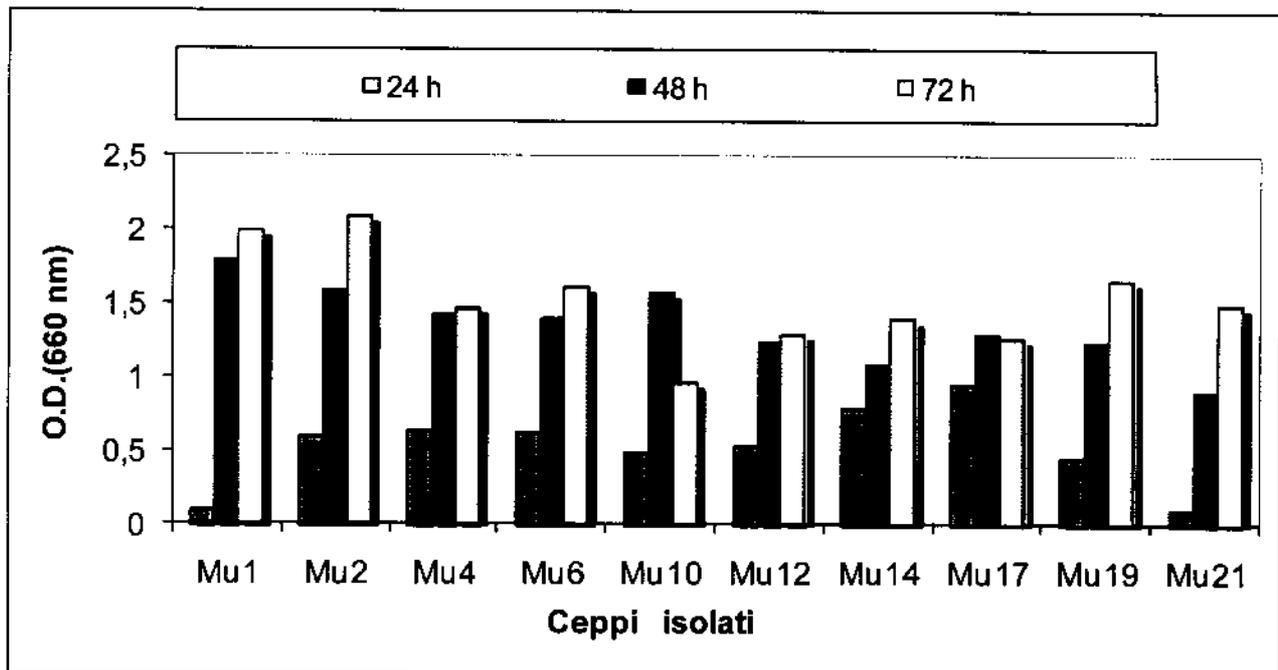


Figura 1. Crescita dei ceppi alofili su terreno A.

Alcuni ceppi (Mu4, Mu12 e Mu17) hanno raggiunto una fase di crescita che si stabilizza a 48 ore su valori di densità ottica compresi tra 1,3-1,4 O.D. I ceppi Mu6, Mu19 e Mu21 hanno superato, a 72 ore di incubazione, i valori di 1,5 O.D. mentre i ceppi Mu1 e Mu2, analizzati per lo stesso tempo di incubazione, hanno raggiunto il valore di 2,0 O.D.

Inoltre, come si può osservare in figura 2, a parità del contenuto di polisaccaridi totali presenti inizialmente al tempo t=0 (contributo dovuto alla composizione del terreno di

crescita A), nel caso dei ceppi Mu1 e Mu4 non si è apprezzata una sostanziale variazione della concentrazione dei polisaccaridi totali nei tempi analizzati. Per il ceppo Mu2 è stata notata invece una drastica diminuzione di polisaccaridi da un valore iniziale di 5.0 g/L al t=0 a quasi 2 g/L a 72 ore di incubazione. Per i ceppi Mu12, Mu19 e Mu21 si è registrata inizialmente un aumento di polisaccaridi (circa 6.0 g/L) a 24 ore per poi diminuire al di sotto di 5.0 g/L nei tempi successivi (t=48 h e t=72 h). I ceppi Mu6, Mu10, Mu14 e Mu17 hanno mostrato, invece, un andamento diverso presentando un'iniziale diminuzione di polisaccaridi a 24 e 48 ore, segno che le fonti di carbonio vengono metabolizzate dal microrganismo, ed un sostanziale aumento (superiore a 6.0 g/L per il ceppo Mu6) a 72 ore dovuto alla sintesi *de novo* di polisaccaridi.

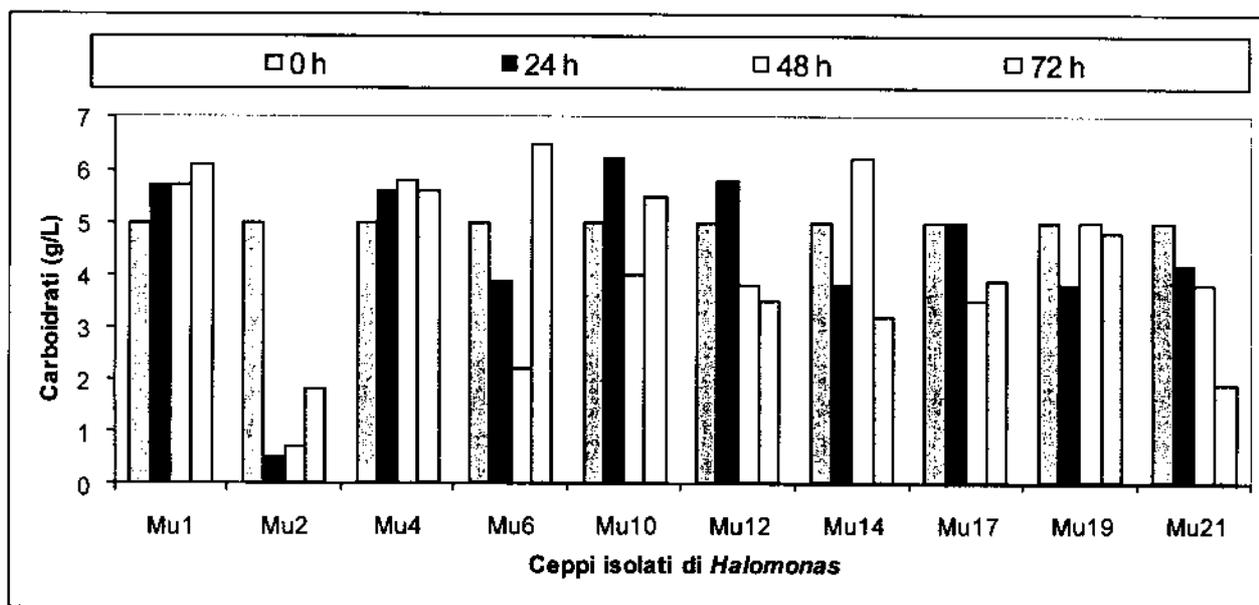


Figura 2. Produzione di EPS da ceppi alofili in terreno A.

Successivamente sono state condotte ulteriori prove di crescita sul ceppo Mu6, denominato *Halomonas* AAD6 in beute da 500 ml contenenti 50 ml di terreno B a cui sono state addizionate diverse fonti di carbonio al 1% (glucosio, lattosio, saccarosio, arabinosio, xilosio, maltosio, raffinosa, fruttosio, galattosio, mannosio, ramnosio, acetato di sodio, glicerolo e trisodocitrato). La produzione di biomassa e di EPS nelle condizioni sopra citate sono state riportate in Tabella 1.

Tabella 1. Prove di crescita e produzione di EPS da *Halomonas* AAD6 su terreno B con diverse fonti di carbonio al 1%.

Fonte di Carbonio	Biomassa (g cellule liofile/L)	EPS prodotto (g/L)	Resa EPS (g/g) EPS/Biomassa
Glucosio	1.108	0	0
Lattosio	0.103	0.060	0.581
Saccarosio	0.863	1.073	1.241
Arabinosio	0.104	0.027	0.263
Xilosio	0.096	0.267	2.773
Maltosio	1.374	0.189	0.138
Raffinosio	0.135	0.206	1.531

Fruttosio	1.548	0	0
Galattosio	1.199	0	0
Mannosio	0.607	0	0
Ramnosio	0.003	0	0
Acetato	0.085	0	0
Glicerolo	0.051	0	0
Trisodiocitrato	0.001	0	0

Come si può osservare dai risultati riportati in tabella 1, la composizione del terreno e, in particolare, la natura della fonte di carbonio influiscono sulla resa (g di biomassa/g di EPS prodotto) degli esopolisaccaridi.

Le migliori fonti di carbonio per la crescita cellulare sono risultate essere il glucosio (1.108 g/L cellule liofile), saccarosio (0.863 g/L), maltosio (1.374 g/L), fruttosio (1.548 g/L), e galattosio (1.199 g/L) come si evince dalla tabella 1. Tuttavia, solo in presenza di saccarosio, il ceppo *Halomonas* AAD6 produce un'elevata quantità di EPS (1.073 g/L) con una resa di EPS pari a 1.241 g/L.

L'EPS prodotto del ceppo *Halomonas* AAD6 è stato recuperato nella fase stazionaria di crescita nelle varie prove di crescita effettuate.

b) In bioreattore

La crescita di *Halomonas* ceppo AAD6 è stata anche eseguita in fermentatore da 5 L, utilizzando 500 ml di terreno B contenente saccarosio al 1% (p/v) in condizioni di crescita standard. È stata valutata la produzione di biomassa e di EPS prelevando aliquote di terreno dal fermentatore a vari tempi: A (20 ore), B (29 ore), C (40 ore) e D (48 ore), (Fig. 1). La resa dell'EPS prodotto a differenti fasi di crescita è risultato essere di 3.368 g/L nella fase esponenziale (prelievo A), 4.502 g/L nella fase esponenziale tardiva (prelievo B), 4.844 g/L nella fase pre-stazionaria (prelievo C) e 5.718 g/L nella fase stazionaria (prelievo D) (Fig. 3).

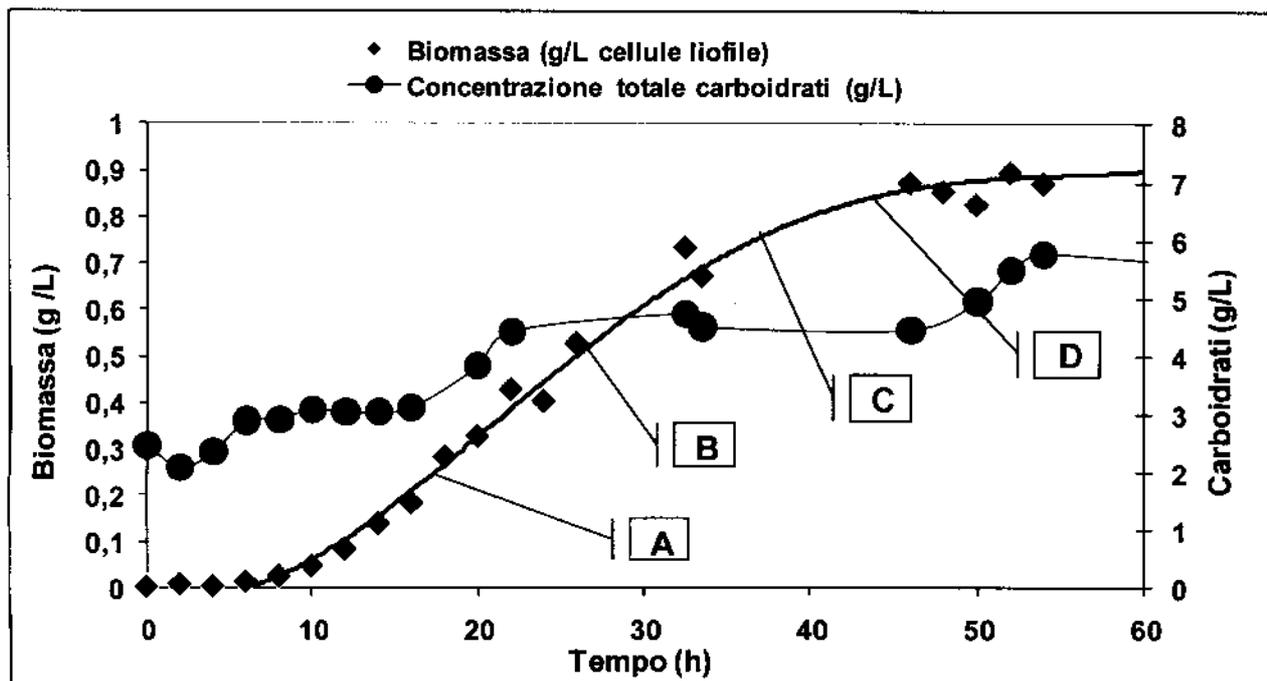


Figura 3. Crescita in bioreattore e produzione di EPS di *Halomonas* AAD6 su terreno B con saccarosio addizionato al 1%.

Analisi della composizione monosaccaridica degli EPS

La composizione in monosaccaridi dell'EPS prodotto dal ceppo *Halomonas* AAD6 su terreno B contenente saccarosio al 1%, è stata determinata mediante idrolisi acida (0.5N TFA a 120°C per 1.5h) seguita da cromatografia a scambio anionico ad alta pressione HPAE-PAD, Dionex. La composizione monosaccaridica è stata determinata attraverso il confronto con i tempi di ritenzione di monosaccaridi standard.

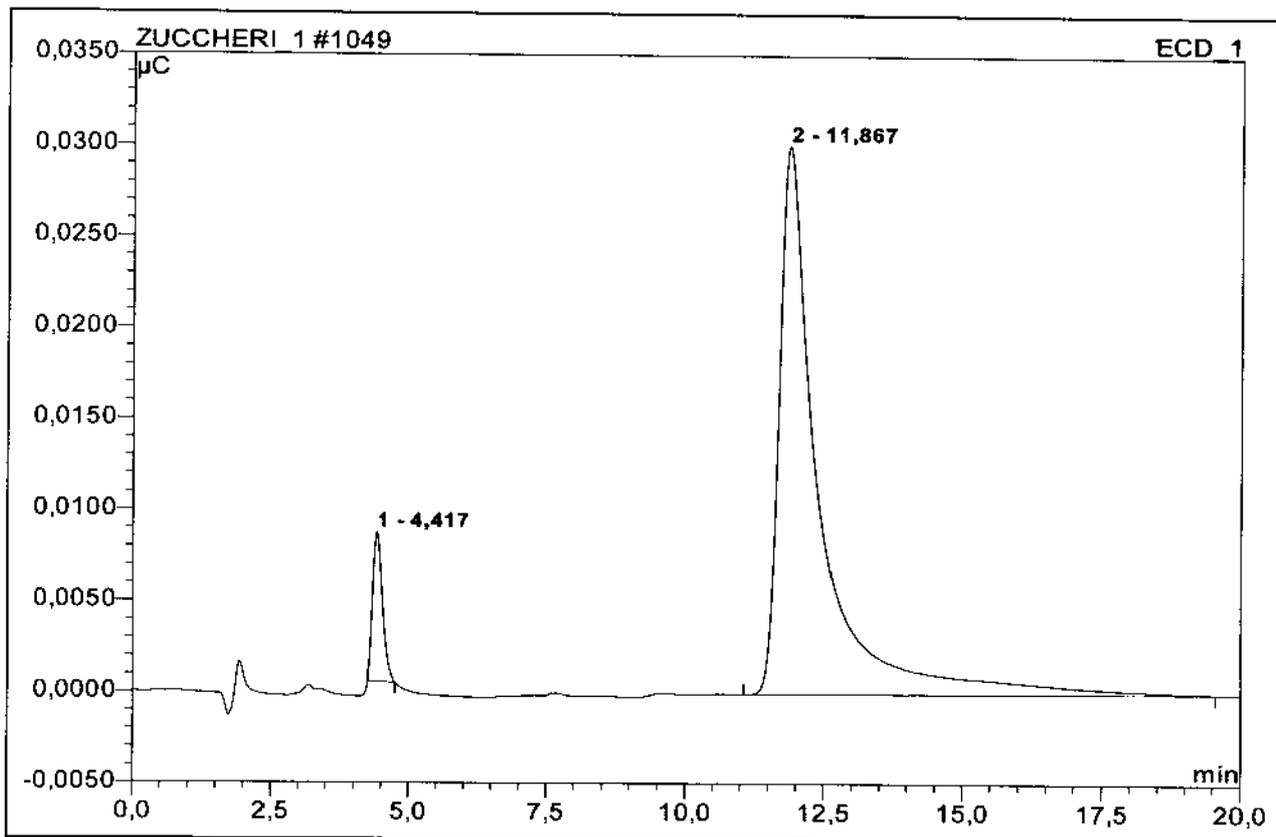


Figura 4. Cromatogramma relativo all'esopolisaccaride grezzo idrolizzato, ottenuto all'HPAE-PAD Dionex.

Il cromatogramma in figura 4 indica che l'EPS ha una composizione in zuccheri costituita da un monosaccaride non identificato (tempo di ritenzione 4.4 minuti) e da fruttosio (tempo di ritenzione 11.8 minuti). I risultati ottenuti hanno dimostrato che il fruttosio rappresenta il monosaccaride principale dell'unità saccaridica dell'EPS essendo il rapporto molare tra il monosaccaride ignoto e il fruttosio circa 0.5 a 1.

Proponente Programma

Dr. Annarita Poli

Annarita Poli