

ZANICHELLI

Fabio Fanti

Biologia, microbiologia e tecnologie di controllo sanitario

Accumuli metabolici

L'accumulo di metaboliti di interesse

Nel **metabolismo anaerobico** (poco redditizio) l'accumulo dei prodotti finali, i metaboliti di interesse, si verifica in modo fisiologico parallelamente allo sviluppo microbico.

Nel **metabolismo aerobico**, o ossidativo, (molto redditizio) si ha la produzione di biomassa, di CO_2 e H_2O come prodotti terminali
→ per accumulare metaboliti intermedi bisogna soddisfare due condizioni:

1. uso di terreni di coltura sbilanciati nella composizione
2. modifica o inattivazione dei meccanismi di regolazione enzimatica

I meccanismi di regolazione enzimatica /1

Gli enzimi metabolici cellulari possono essere:

- **enzimi costitutivi:** prodotti a prescindere dalle condizioni colturali
- **enzimi inducibili:** sintetizzati dal microrganismo esclusivamente in presenza di induttore (es. substrato specifico)
- **enzimi reprimibili:** influenzati dalla concentrazione del prodotto finale, che agisce come co-repressore

La loro concentrazione dipende dai sistemi di controllo a feedback:

- **inibizione dell'attività enzimatica**
- **espressione della sintesi dell'enzima**

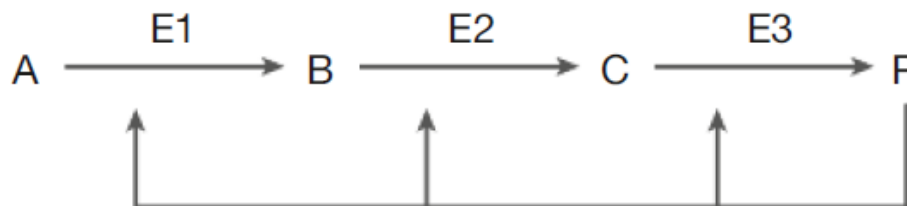
I meccanismi di regolazione enzimatica /2

1. Via metabolica lineare: porta a un unico prodotto finale.

Inibizione da feedback: il prodotto finale inibisce l'attività di uno degli enzimi coinvolti nella catena metabolica, spesso il primo.



Repressione da feedback: un prodotto di reazione reprime a livello genetico la sintesi di un enzima della catena metabolica, attraverso il controllo della trascrizione dell'mRNA.

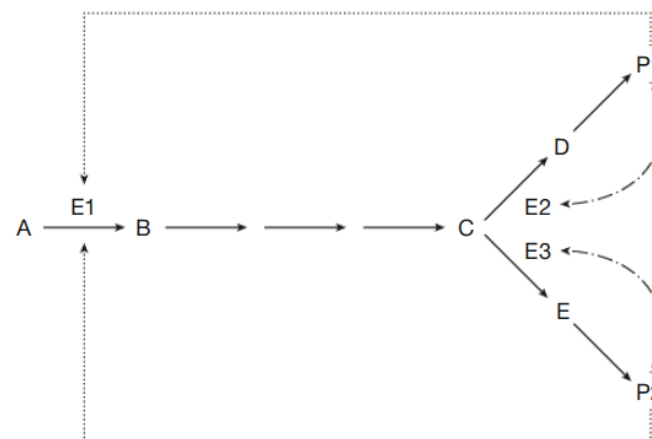
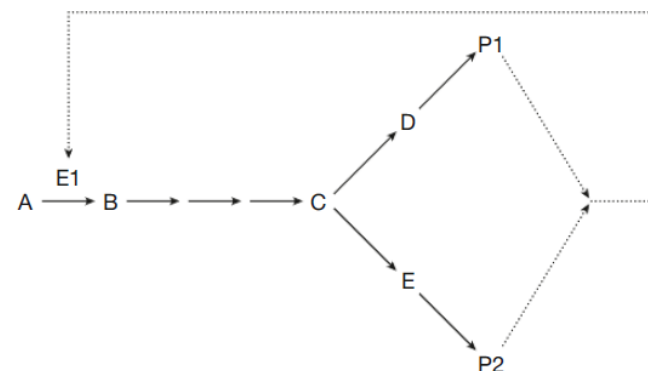


I meccanismi di regolazione enzimatica /3

2. Via metabolica ramificata: dopo un punto di ramificazione si ottengono prodotti diversi.

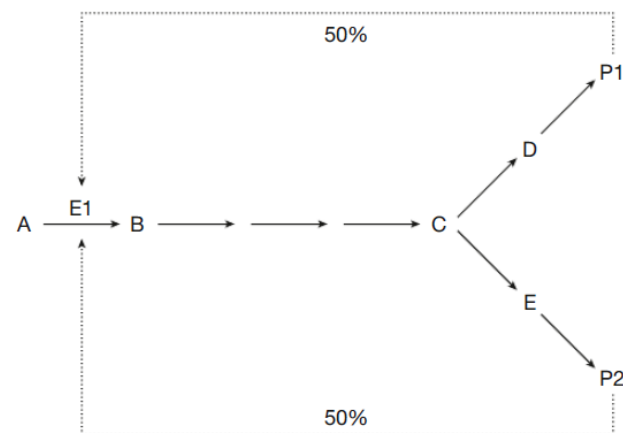
Feedback multivalente: la regolazione è data dall'azione della somma dei prodotti sul primo enzima della catena, per inibizione e/o repressione.

Feedback cooperativo: l'effetto inibitore è dato da uno solo dei prodotti metabolici, sia sul primo enzima della catena che sul primo enzima successivo al punto di ramificazione.

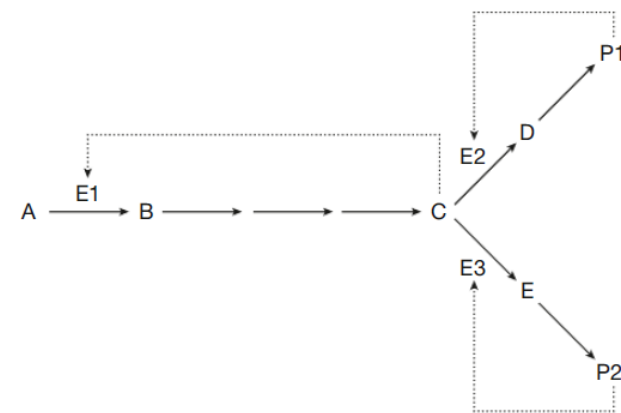


I meccanismi di regolazione enzimatica /4

Feedback cumulativo: uno dei prodotti finali inibisce in modo parziale il primo enzima della catena, in modo indipendente dagli altri prodotti.



Feedback sequenziale: entrambi i prodotti inibiscono il primo enzima di ogni ramificazione dopo il punto di separazione. L'ultimo intermedio prima della ramificazione si accumula e inibisce a feedback il primo enzima della via metabolica.

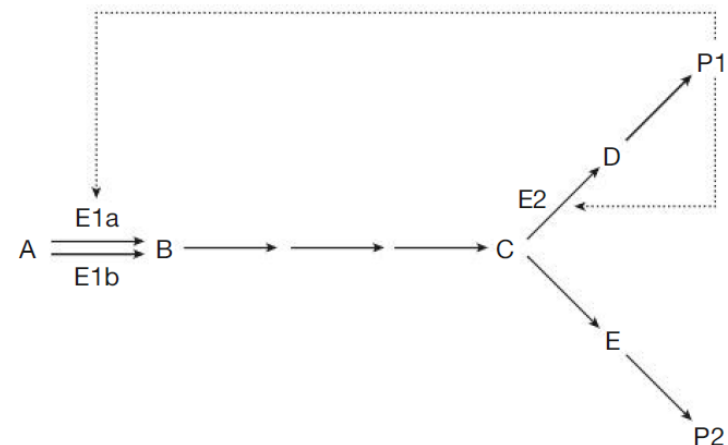


I meccanismi di regolazione enzimatica /5

Isoenzimi: forme enzimatiche che svolgono la stessa reazione, ma differiscono per caratteristiche fisico-chimiche e relativi sistemi di controllo.

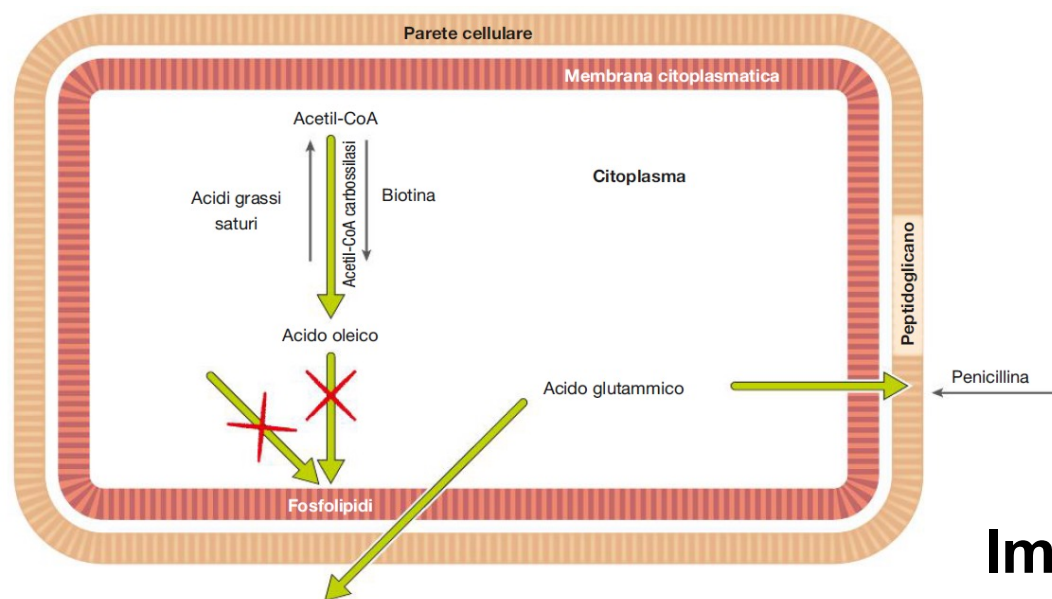
Può verificarsi l'inibizione da parte di uno dei prodotti sia sulla via specifica dopo la ramificazione sia sulla specifica forma isoenzimatica su cui il prodotto (P1) agisce.

L'accumulo dell'intermedio che precede il punto di ramificazione (C) si traduce nella sua trasformazione nel prodotto P2 che non ha esercitato inibizione.



Le strategie per ottenere accumuli di metaboliti microbici

Modificazione della permeabilità della membrana cellulare



Impiego di mutanti: auxotrofi o regolatori o insensibili alla repressione

Le tecniche di selezione dei ceppi microbici

Strategie per l'ottenimento di nuovi metaboliti microbici:

- **Isolamento** di ceppi microbici per la produzione di nuovi metaboliti
- **Modificazione chimica** di molecole già note
- **Biotrasformazioni** a opera di microrganismi o enzimi per la modifica di molecole ottenute per via chimica o microbiologica
- **Fusione di protoplasti interspecifica** per la ricombinazione di informazioni genetiche fra ceppi produttori
- **Clonaggio di geni** per il trasferimento di informazioni genetiche fra ceppi non correlati

Strategie e procedure di screening

Per **produrre un nuovo metabolita**, occorre:

- individuare la via biochimica in cui la molecola – target è coinvolta
- intervenire sui sistemi di regolazione enzimatica
- indirizzare o deviare il metabolismo microbico verso la molecola di interesse.

Per ottenere nuove molecole si attua lo **screening primario**:

1. Isolamento di colture
2. Saggi di attività
3. Analisi cromatografica dei campioni del filtrato colturale

La selezione di ceppi alto-produttori /1

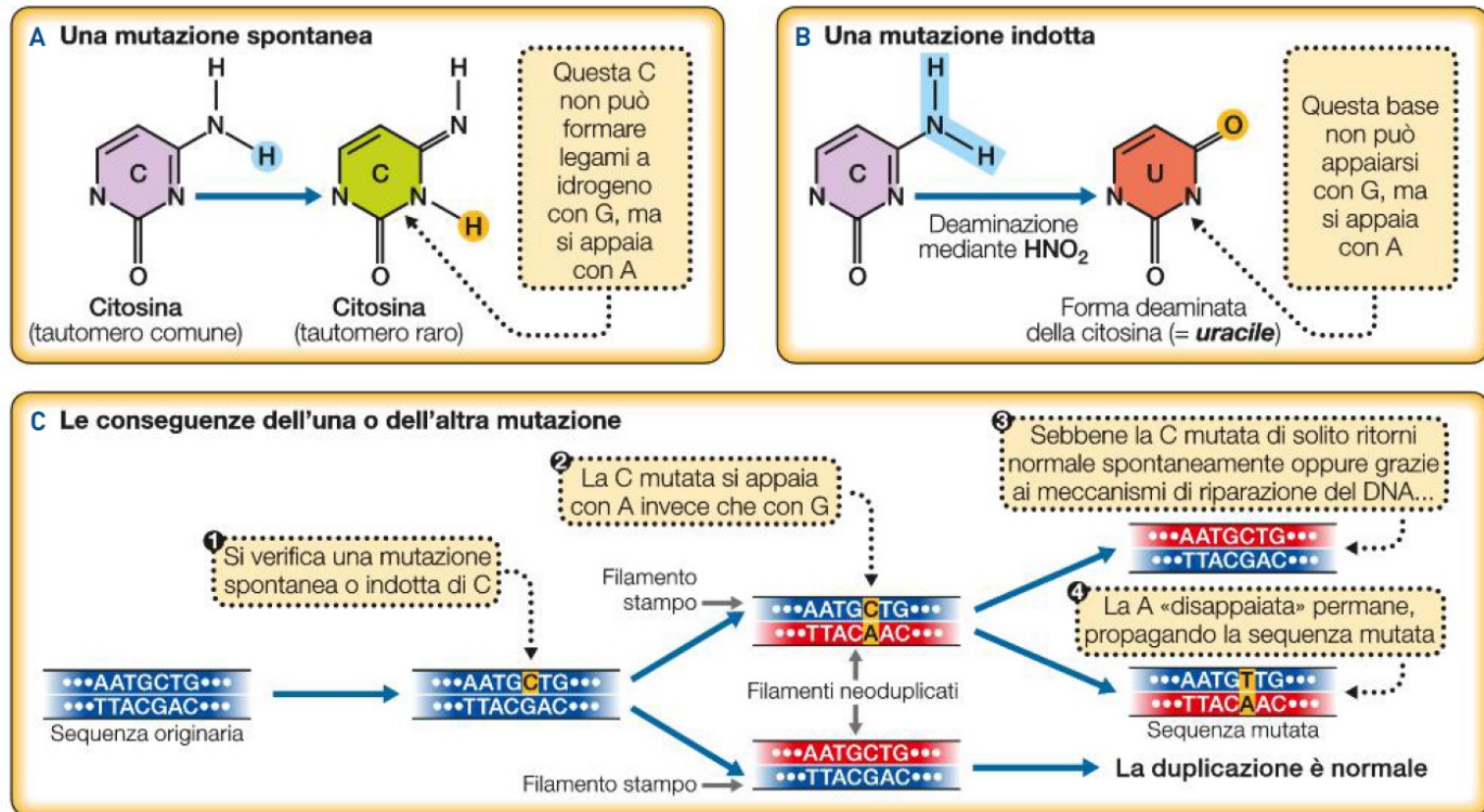
Lo **screening secondario** è avviato quando la fase primaria ha portato all'isolamento di ceppi in grado di produrre la sostanza di interesse.

Per migliorare le rese produttive si selezionano i **ceppi alto – produttori**, impiegando tecnologie genetiche basate su:

- fenomeni naturali: mutazioni spontanee ed eventi di ricombinazione genetica
- eventi provocati: mutazioni indotte, meccanismi di ricombinazione genetica, fusione di protoplasti, ibridazione fra cellule e ingegneria genetica

La selezione di ceppi alto-produttori /2

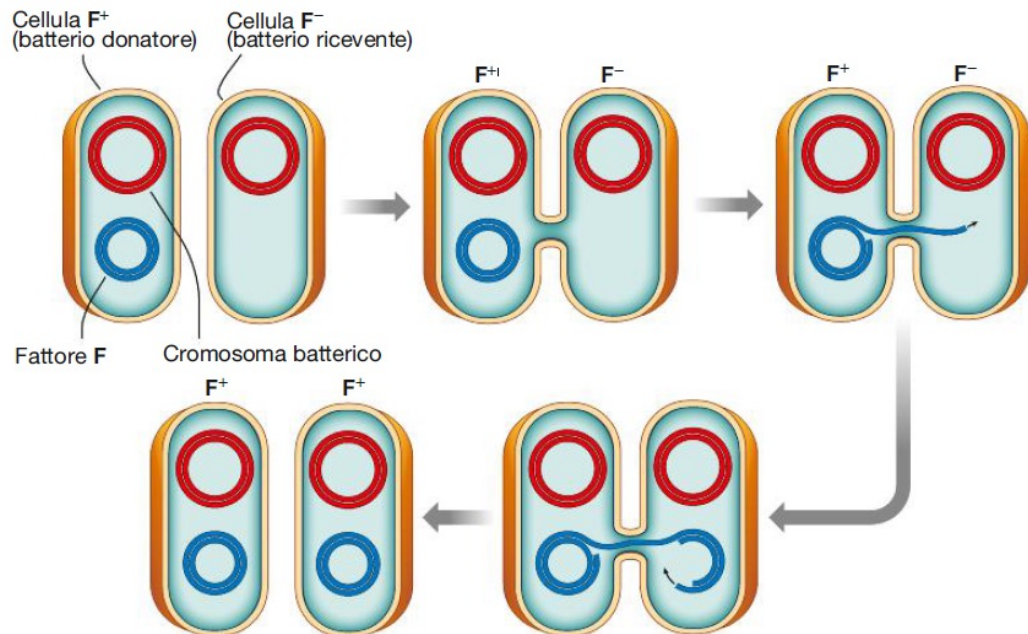
Mutazioni: spontanee o indotte, per mezzo di agenti mutageni fisici (raggi X, γ e UV) e chimici (analoghi delle basi, acridina, agenti alchilanti, enzimi che interferiscono con la sintesi del DNA).



La selezione di ceppi alto-produttori /3

Ricombinazione genetica:

- nei procarioti per coniugazione, trasformazione e trasduzione
- negli eucarioti principalmente nella meiosi con il *crossing-over*

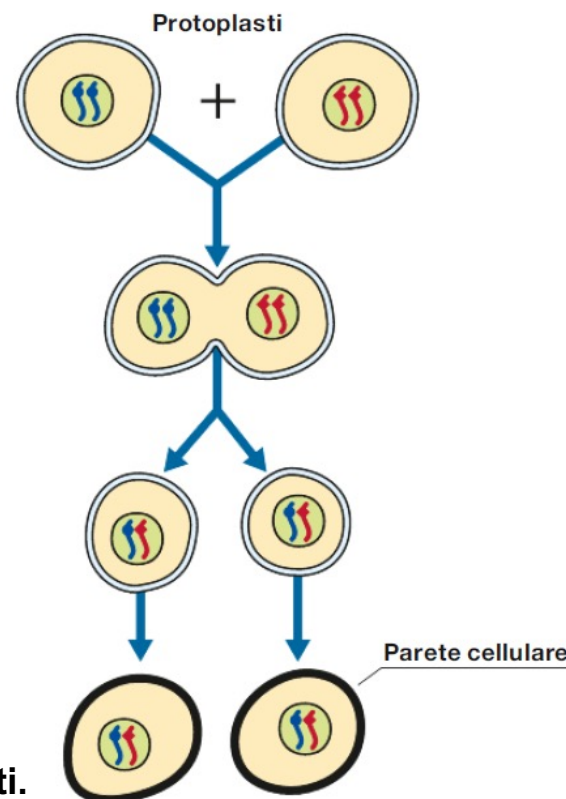


Tipi sessuali di batteri, F^+ , F^- e coniugazione batterica.

La selezione di ceppi alto-produttori /4

Ibridazione di lieviti: utilizzando caratteri di due ceppi diversi ma compatibili per ottenere uno zigote ibrido con corredo cromosomico diploide.

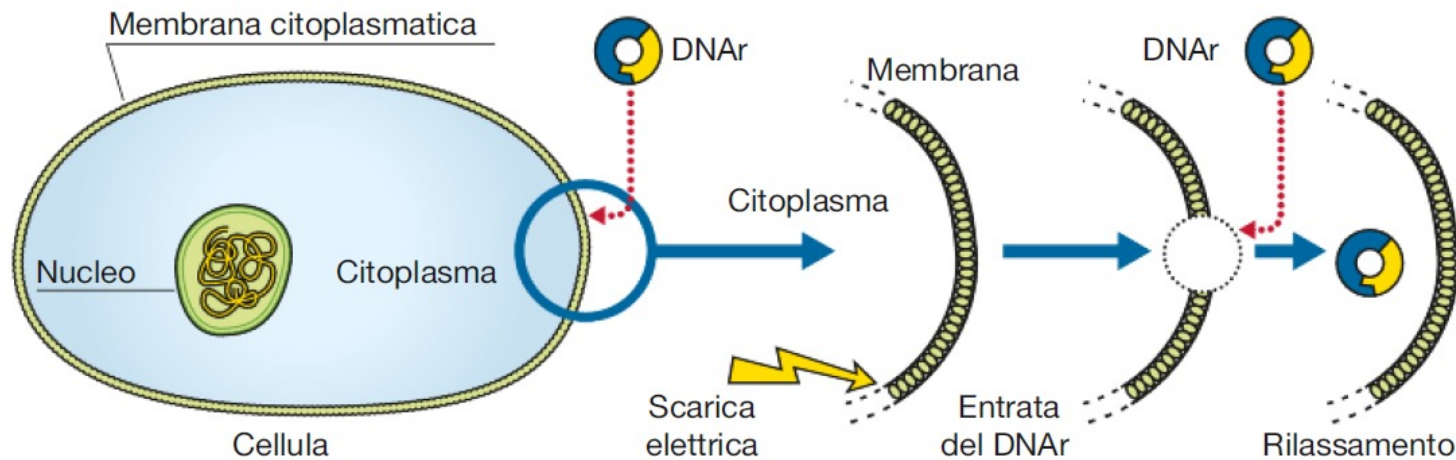
Fusione di protoplasti: cellule private della parete cellulare tramite trattamenti con enzimi litici in ambiente osmoticamente controllato.



Fusione di protoplasti.

La selezione di ceppi alto-produttori /5

Elettroporazione: si sottopone la cellula ricevente a ripetute scariche elettriche a intervalli regolari, che allargano i pori della membrana cellulare per inserire molecole di DNA esogeno.



DNA ricombinante: un frammento di DNA viene clonato in un vettore e inserito nell'ospite.