

DOTTORATO DI RICERCA

Biocatalisi Applicata e Microbiologia Industriale

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: CHIM-11

ADATTAMENTO E ACCLIMATAZIONE A DIVERSE TEMPERATURE
DI LIEVITI PSICROFILI OBBLIGATI E FACOLTATIVI
E DI LIEVITI MESOFILI.
STUDIO DELLA PRODUZIONE DI ACIDI GRASSI POLINSATURI
 ω -3 E ω -6 PER VIA FERMENTATIVA.

Presentata da:

Dott.ssa *Lisa Cordisco*

Coordinatore del Dottorato:

Prof. *Alejandro Hochkoeppler*

Relatore

Prof. *Diego Matteuzzi*

Esame finale anno 2009

Indice

	Pag
Introduzione	
Capitolo 1	
Gli acidi grassi essenziali omega-3 ed omega-6: dalla loro scoperta ad oggi	1
Gli acidi grassi polinsaturi: definizione e struttura	4
Biodisponibilità degli acidi grassi polinsaturi e fonti dietetiche di EFA	7
L'assorbimento dei lipidi nell'uomo	14
Funzioni biologiche degli EFA	17
I PUFA come criterio tassonomico	33
Prodotti alimentari fortificati con n-3 PUFA	33
Capitolo 2	
Gli acidi grassi polinsaturi di origine microbica	44
La biochimica dell'oleagenicità dei microrganismi	50
La biosintesi degli acidi grassi polinsaturi (PUFA)	54
Modulazione del metabolismo degli EFA	62
Il caso dei lieviti oleaginosi: l'accumulo dei lipidi	63
Composizione della membrana lipidica dei microrganismi psicrofili	68
Capitolo 3	
Parte prima: la vita nella criosfera	71
Lieviti psicrofili isolati dai ghiacciai alpini	72
Le risposte genetiche al freddo	74
Caratteristiche dei ghiacciai colonizzati dai lieviti psicrofili	76
Raccolta dei campioni	77
Analisi microbiologiche	77
Determinazione delle attività enzimatiche extracellulari dei lieviti isolati	78
Isolamento e preliminare clusterizzazione dei lieviti isolati	79
Identificazione molecolare dei lieviti isolati	79

Parte seconda: i lieviti mesofili	81
Parte terza: <i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	86
<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21: un potenziale Single Cell Oil (SCO)	89
Parte quarta: le fermentazioni industriali	92
Effetto della temperatura sullo sviluppo microbico	95
Capitolo 4	
Metodi di analisi dei lipidi convenzionali e non	97
La gascromatografia	98
La spettroscopia di fluorescenza	103
Nile Red e sue proprietà foto fisiche	104
Spettri di assorbimento	105
Spettri di emissione e di eccitazione	106
Rendimento quantico di emissione	108
Misure dei tempi di vita degli stati eccitati	109
Anisotropia di fluorescenza	111
Scopo della tesi	116
Materiali e metodi	121
Ceppi e condizioni di coltura	121
Prove di crescita in beuta, scale up in fermentatore e parametri monitorati	124
Colture batch in bioreattore	125
Metodiche analitiche adoperate	128
Misurazione della massa cellulare: torbidità e peso secco	128
Misurazione del numero di cellule:	128
conta microscopica e conteggio vitale su piastra	
Analisi del glucosio con HPLC	129
Colorazione dei lipidi intracellulari ed osservazione al microscopio	130
Estrazione ed analisi dei lipidi mediante GC/MS	130
Misure di spettroscopia di fluorescenza	133
Acquisizione degli spettri di assorbimento, di emissione	135

e di eccitazione	
Analisi statistica dei dati	136
Dati sperimentali	
Parte prima: lo screening iniziale	138
Parametri monitorati dei lieviti psicrofili e mesofili coltivati in modalità batch	138
Definizione dei 3 gruppi di lieviti: A, B e C	139
La cinetica dello sviluppo batch a 4, 18 e 30°C	141
Velocità specifica di crescita μ_{\max} e resa in biomassa $Y_{X/S}$	146
Resa in lipidi ($Y_{L/X}$) e composizione degli estratti	148
Parte seconda: prove di fermentazione in bioreattore	155
L'effetto del rapporto C:N sulla cinetica di crescita e sull'accumulo dei lipidi in <i>Rhodotorula glacialis</i>	155
Crescita su terreno GMY a basso C:N	156
Crescita su terreno GMY ad alto C:N	157
Colture batch di <i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4785 a diverse temperature	158
Composizione della frazione lipidica recuperata da <i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4785 a diverse temperature	160
La fermentazione batch di <i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4785 a -3°C	163
Prove di fermentazione in bioreattore di <i>Schizochytrium limacinum</i> SR-21	166
Cinetica di sviluppo	167
Parte terza: Nile Red e misure di fotofisica	171
Misure relative agli standard lipidici	171
Caratterizzazione degli standard lipidici	176
Misure sui campioni di lievito psicrofilo obbligato <i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4785 e facoltativo <i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4722	179
Misure di assorbimento e di emissione su <i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4785	182
Discussione	185

Conclusioni	201
Bibliografia	205

Adattamento e acclimatazione a diverse temperature di lieviti psicrofili obbligati e facoltativi e di lieviti mesofili. Studio della produzione di acidi grassi polinsaturi ω -3 e ω -6 per via fermentativa.

Introduzione

Capitolo 1

Gli acidi grassi essenziali omega-3 ed omega-6: dalla loro scoperta ad oggi

L'interesse nei confronti degli acidi grassi poliinsaturi o PUFA (Polynsaturated Fatty Acid) è riconducibile agli anni '70 e agli studi epidemiologici condotti da Bang e Dyenbergh (Bang *et al.*, 1976). In particolare, essi osservarono che gli eschimesi Inuit, residenti nel luogo d'origine, mostravano un'incidenza minore di eventi cardiovascolari e di cardiopatia ischemica rispetto alla controparte residente in Danimarca o emigrata nei Paesi industrializzati. Tale osservazione poteva essere unicamente correlata a differenti abitudini alimentari e, in particolare, alla maggiore assunzione di pesce negli Inuit residenti in Groenlandia.

Da allora centinaia di studi convertirono sui benefici degli omega-3 (ω -3), documentate da un numero impressionante di pubblicazioni che ha reso il termine omega-3 familiare, oggi, anche ai "non addetti". In particolare, si cominciò a raccomandare il loro uso nella prevenzione della patologia

cardiovascolare aterosclerotica ed in molte patologie croniche degenerative legate ad una condizione infiammatoria cronica dell'organismo.

Tuttavia, in merito agli acidi grassi polinsaturi, gli anni '20 del secolo passato sono stati i più fruttuosi. Nel 1929, infatti, per la prima volta G. Burr e M. Burr scoprono che l'acido linoleico (AL), capostipite degli acidi grassi della serie omega-6, e l'acido alfa-linolenico (ALA), capostipite della serie omega-3, sono indispensabili per la salute dell'uomo (Burr et al., 1929). Furono, quelli, definiti acidi grassi essenziali (AGE) in quanto l'organismo umano non essendo in grado di sintetizzarli, deve introdurli con gli alimenti così da mantenere uno stato di benessere.

I primi derivati degli AGE furono denominati "prostaglandine", perché trovati in piccole quantità nel liquido prostatico e nella prostata e delle quali, negli anni '80, si scoprirono la biochimica e la fisiologia. I frutti delle numerose ricerche fatte in questo campo si concretizzarono nel 1984 con la scoperta di altre molecole biologicamente attive. Erano mediatori lipidici ad azione antiinfiammatoria come le lipoxine (LX) e le resolvine, derivate dall'acido eicosapentaenoico (EPA) e dall'acido docosaesaenoico (DHA), infine le protectine (PD) o neuroprotectine (NPD), derivate dal DHA. Composti, tutti, che intervengono nella fase di risoluzione del processo infiammatorio.

Con il dopoguerra, il miglioramento delle condizioni socio-economiche, che si ebbero in particolare nel mondo occidentale più industrializzato, portò a variazioni dietetiche che a causa di una progressiva e rilevante aumentata assunzione di lipidi animali e di oli di semi, si concretizzarono nella comparsa di un insieme di quadri patologici riassunti nella definizione di "patologia del benessere" (Caramia G, 2007). In pratica l'eccessiva assunzione di omega-6, molto rappresentati in quegli alimenti, con progressivo ridotto apporto di omega-3, portò ad un'alterazione del rapporto ottimale omega-6/omega-3 che da circa 5-6:1, con un apporto di energia pari

al 3% da acidi grassi omega 6 e 0,5% da acidi grassi omega 3, superò il valore di 20:1 che si è mantenuto inalterato fino ai giorni d'oggi. Ora, gli acidi grassi omega-6 e omega-3, come appena ricordato, intervengono attivamente nell'equilibrio fra mediatori lipidici pro e anti infiammatori, per cui, quando prevalgono i primi, è più frequente la comparsa di patologie croniche-infiammatorie e degenerative.

Tuttavia, molto tempo prima di tali scoperte, siamo nel 1782, il medico inglese T. Percival suggerì di far assumere l'olio di fegato di merluzzo nel tentativo di prevenire e curare i soggetti affetti da rachitismo, malattia molto diffusa a quel tempo in Inghilterra, in tutta l'Europa del Nord e nell'America del Nord (Caramia G, 2007). Tale condizione morbosa nota dai tempi più antichi (130-200 d.C.), era inizialmente imputata a sole carenze nutritive ed igieniche e quando Percival raccomandò l'uso dell'olio di fegato di merluzzo, supportato anche da segnalazioni del noto medico A. Trousseau, non essendo noto il meccanismo d'azione di quello sulla malattia, sollevò non poche perplessità.

L'effetto preventivo e terapeutico dell'olio di fegato di merluzzo venne confermato da un reale studio clinico controllato solo dopo la fine della prima guerra mondiale, dalla Dr.ssa Click di Vienna. A sostegno di questi studi contemporaneamente C. Funk inventò il termine "Vitamins" e McCollum E.V. e collaboratori nel 1913 scoprirono nel tuorlo d'uovo e nel burro un fattore liposolubile indispensabile per la crescita che fu denominato "Vitamina D", infine nel 1928, il chimico tedesco A. Windaus ricevette il Premio Nobel della chimica per gli "studi sui lipidi e sulla loro connessione con le vitamine ed in particolare con la vitamina D".

Il ruolo svolto dall'olio di fegato di merluzzo dall'inizio del suo impiego non si è limitato solo alla prevenzione del rachitismo, per la sua azione sull'assorbimento del calcio, sulla formazione delle ossa e sulla crescita. Negli anni '30, durante e dopo la seconda guerra mondiale e per qualche

decennio ancora, ha rappresentato una grande conquista preventiva-terapeutica e di civiltà. Per il suo alto contenuto di vitamina A, di iodio, e di acidi grassi omega-3 ha permesso prima ancora che molte delle attuali conoscenze venissero acquisite, un recupero delle condizioni di salute soprattutto delle classi più abbienti e ha certamente svolto un'azione preventiva di molte condizioni patologiche in quanti lo hanno regolarmente assunto. Con un cucchiaino di olio di fegato di merluzzo, dato ai bambini nei mesi invernali dalla metà degli anni '30 fino alla fine degli anni '50, c'era l'apporto di circa 2 grammi di omega-3 al giorno. Questa pratica ha certamente contribuito a favorire lo sviluppo e la funzionalità del cervello, della retina e del tessuto nervoso in generale. È stato inoltre utile per formare un'adeguata elasticità delle pareti delle arterie, prevenendo o ritardando i disturbi cardiovascolari, per un corretto funzionamento del sistema immunitario e per prevenire, o almeno ritardare, la comparsa di processi infiammatori-degenerativi cronici. In questo ambito i recenti preparati naturali a base di olio di fegato di merluzzo continuano a mantenere la loro attualità, in quanto virtualmente privi di controindicazioni.

Oggi, è ben noto che gli acidi grassi sono costituenti indispensabili per la crescita e la sopravvivenza di tutti gli organismi. Tutte le cellule del corpo umano contengono gli AGE ma ne sono particolarmente ricchi i tessuti nervosi; infatti, oltre il 60% del peso del cervello è costituito da soli acidi grassi essenziali, non a caso, la maggiore sede di omega-3 polinsaturi a lunga catena presente nel corpo è localizzata proprio nel cervello.

Gli acidi grassi polinsaturi: definizione e struttura

Gli acidi grassi presenti in natura si distinguono, in base all'assenza o alla presenza di doppi legami, in saturi e insaturi, rispettivamente. Gli acidi grassi insaturi, a loro volta, si differenziano in monoinsaturi o in poliinsaturi in

relazione al numero di doppi legami presenti nella loro molecola. L'introduzione di doppi legami, ovvero il passaggio da acidi grassi saturi a molecole progressivamente più "insature", costituisce un elemento strutturale e funzionale di primaria importanza.

La presenza in serie di doppi legami conferisce alla catena carboniosa il progressivo incremento dei punti di torsione, proprio in corrispondenza del doppio legame. A livello tridimensionale ciò comporta la crescente tendenza degli acidi grassi polinsaturi ad assumere una conformazione meno rigida che, sul piano morfo-funzionale, corrisponde ad una crescente fluidità delle membrane entro cui i PUFA sono incorporati.

I mammiferi possono sintetizzare acidi grassi ad eccezione di quelli col legame C=C oltre il carbonio 9. Sono questi, gli acidi grassi essenziali (EFA, Essential Fatty Acids) (Das U.N. 2006). Gli EFA, come importanti costituenti delle membrane cellulari, regolano fluidità, flessibilità e permeabilità selettiva, influenzando il comportamento di certi enzimi legati alla membrana e dei loro recettori.

Esistono almeno quattro famiglie indipendenti di PUFA, secondo l'acido grasso che ne costituisce il precursore: la serie degli ω -3, derivati dell'acido alfa-linolenico (ALA, 18:3,n-3); la serie degli ω -6, derivati dell'acido linoleico (LA, 18:2,n-6); la serie degli ω -9, derivati dell'acido oleico (OA, 18:1,n-9); la serie degli ω -7, derivati dell'acido palmitoleico (PA, 16:1,n-7). Fra queste 4 famiglie, solo quella degli omega-3 ed omega-6 possono dirsi essenziali; gli acidi oleico e palmitoleico, sono, infatti, sintetizzati nei mammiferi a partire dai semplici precursori.

I principali PUFA omega-3, contenuti pressoché esclusivamente nel pesce, sono l'acido eicosapentaenoico (EPA, C20:5,n-3) e docosaesaenoico (DHA, C22:6,n-3), l'ultimo dei due maggiormente rappresentato nel corpo umano.

I principali PUFA omega-6, contenuti specialmente negli oli vegetali e nella carne, sono rappresentati dall'acido γ -

linolenico (GLA, C18:3,n-6) e dall'acido arachidonico (AA, C20:4,n-6).



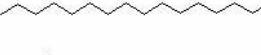
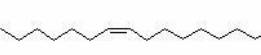
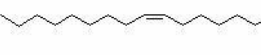
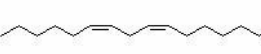
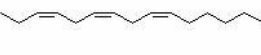

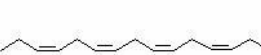

Nomenclatura abbreviata	Struttura chimica
Acidi grassi saturi (SFA)	
14:0	
16:0	
18:0	
Acidi grassi monoinsaturi (MUFA)	
16:1n-7	
18:1n-7	
Acidi grassi poliinsaturi (PUFA)	
18:2n-6	
18:3n-3	
20:5n-3	
22:5n-3	
22:6n-3	

Fig.1. Tipi principali di acidi grassi.

Il cervello è il maggior serbatoio di DHA nell'organismo. Il DHA è associato ad un ottimale sviluppo cerebrale nella vita fetale e nell'infanzia. Fortemente conservato nelle sinapsi, per il ruolo centrale che svolge nel funzionamento e nella trasmissione dell'impulso nervoso, è presente nell'85% dei fosfolipidi di membrana del sistema nervoso centrale. Noto è il suo ruolo nel contribuire a rendere più fluide le membrane neuronali, favorendo le attività enzimatiche connesse alle funzioni neurorecettoriali e modulando quelle dei neurotrasmettitori. Concentrazioni molto elevate di DHA sono pure presenti nella retina, dove è indispensabile per ricevere gli stimoli visivi, nei mitocondri e nei tessuti degli organi riproduttivi. Pertanto, l'integrità e la funzionalità dei neuroni, durante tutta la vita, dipende certamente da fattori

genetici ma anche dall'apporto alimentare di EFA, dai quali, attraverso conversioni metaboliche, si generano quei PUFA a lunga catena essenziali al loro funzionamento (Whelan J. et al., 2006).

L'acido arachidonico (ARA: C20:4,n-6) è importante invece per la crescita del feto e dell'organismo in genere. Lo sottolinea il fenomeno della biomagnificazione, che consiste nel trasferimento, durante la gravidanza, nel sangue cordonale e nel circolo fetale, di ARA e DHA dalla madre al feto: in questo periodo temporale e soprattutto negli ultimi mesi della gestazione, è particolarmente importante l'apporto di tali AG essenziali, per garantire il corretto sviluppo del feto e per salvaguardare la salute della madre.

Il latte umano materno è ricco di tutti gli acidi grassi essenziali, caratteristica questa che contribuisce a spiegare perché i bambini allattati al seno siano immunologicamente più resistenti nel corso della loro vita di quelli nutriti con latte artificiale. Il latte bovino per esempio contiene solo piccole quantità di GLA, DGLA e ARA.

In generale, tutti gli EFA, svolgono importanti funzioni strutturali, di trasporto e metaboliche, fra loro, tutte, strettamente collegate e controllate tanto da elementi genetici quanto, come già detto, dall'apporto qualitativo e quantitativo di lipidi alimentari (Caramia G. 2007). Altre funzioni sono poi mediate dagli EFA a seguito della loro conversione ad eicosanoidi e altri metaboliti.

Biodisponibilità degli acidi grassi polinsaturi e fonti dietetiche di EFA

Gli acidi grassi omega-3 hanno una reperibilità assai limitata negli alimenti convenzionali, essendo presenti esclusivamente in organismi che nel corso dell'evoluzione si sono adattati ad ambienti acquatici o in certi alimenti "nicchia" non

adeguatamente esplorati, quali rane, lumache, o carni di erbivori non ruminanti (equini). Negli organismi superiori gli omega-3 polinsaturi si localizzano nelle membrane di cellule ad alta specializzazione funzionale e in sistemi biologici complessi come quello nervoso, cardiovascolare e immunitario dove svolgono ruoli articolati. Questi, si schematizzano in strutturali, che gli AG PUFA svolgono come componenti di glicerofosfolipidi nelle membrane sinaptiche del sistema nervoso, o funzionali che svolgono come componenti di fosfolipidi dei canali ionici intermembrana delle cellule cardiache, quando coinvolti nelle risposte recettoriali e nella trasduzione dei segnali cellulari o in quanto mediatori lipidici in cellule infiammatorie.

La loro presenza in certi microrganismi relativamente semplici, come le alghe autoctone dei mari freddi, è legata a processi di adattamento della specie all'ambiente in cui questa nasce e si sviluppa. L'alta pressione idrostatica, la temperatura in genere bassa, e la ridotta tensione di ossigeno, hanno richiesto la produzione di acidi grassi ad elevato livello di insaturazione, come sono l'EPA e il DHA (Thomas D. N. et al., 2002), di modo che inseriti nelle membrane biologiche potessero conservarne la funzionalità necessaria per la sopravvivenza e lo sviluppo delle specie indicate in condizioni estreme di pressione e temperatura, come sono quelle degli ambienti subacquei.

A loro volta, i pesci che popolano questi mari hanno accumulato nelle loro carni quantità notevoli di composti omega-3 a lunga catena ed alta insaturazione nutrendosi di quelle alghe autoctone oleaginose, che ne hanno così permesso la sopravvivenza e la crescita.

Per contro, nel mondo vegetale terrestre, che si è sviluppato in un ambiente con caratteristiche assai diverse, non sono presenti quegli stessi omega-3, tuttavia, si riscontrano solo in alcune piante, gli omega-3 a minor grado di insaturazione e a catena più corta come l'acido α -linolenico (ALA: C18:3,n-3).

L'omega-3 ALA è tipicamente presente in certe fonti alimentari vegetali della dieta mediterranea, come negli olii di colza a basso erucico, semi di lino, noci e legumi. Nelle cellule degli organismi animali compreso l'uomo, il grado di convertibilità dell'ALA nei derivati omega-3 a lunga catena e alto grado di insaturazione, dei quali è precursore, non è stato ancora adeguatamente valutato. Più precisamente, uno studio condotto di recente, sosterebbe che in popolazioni vegetariane, ad alto consumo di ALA, i livelli ematici di EPA non sarebbero apprezzabilmente inferiori rispetto ai consumatori di pesce (Morris D.H. 2006). Tale risultato è stato confermato da un altro lavoro che ha valutato gli effetti che il consumo di noci, alimento molto ricco in ALA (1,2 g/4 noci), ha sui livelli ematici di omega-3 in soggetti sani. Lo studio, ha dimostrato che assumendo 4 noci al giorno, vi è un aumento notevole di ALA, ma anche di EPA e che le noci, note per i loro effetti salutistici, sono un'ottima fonte di omega-3 in grado di elevare i livelli ematici anche dei composti altamente insaturi.

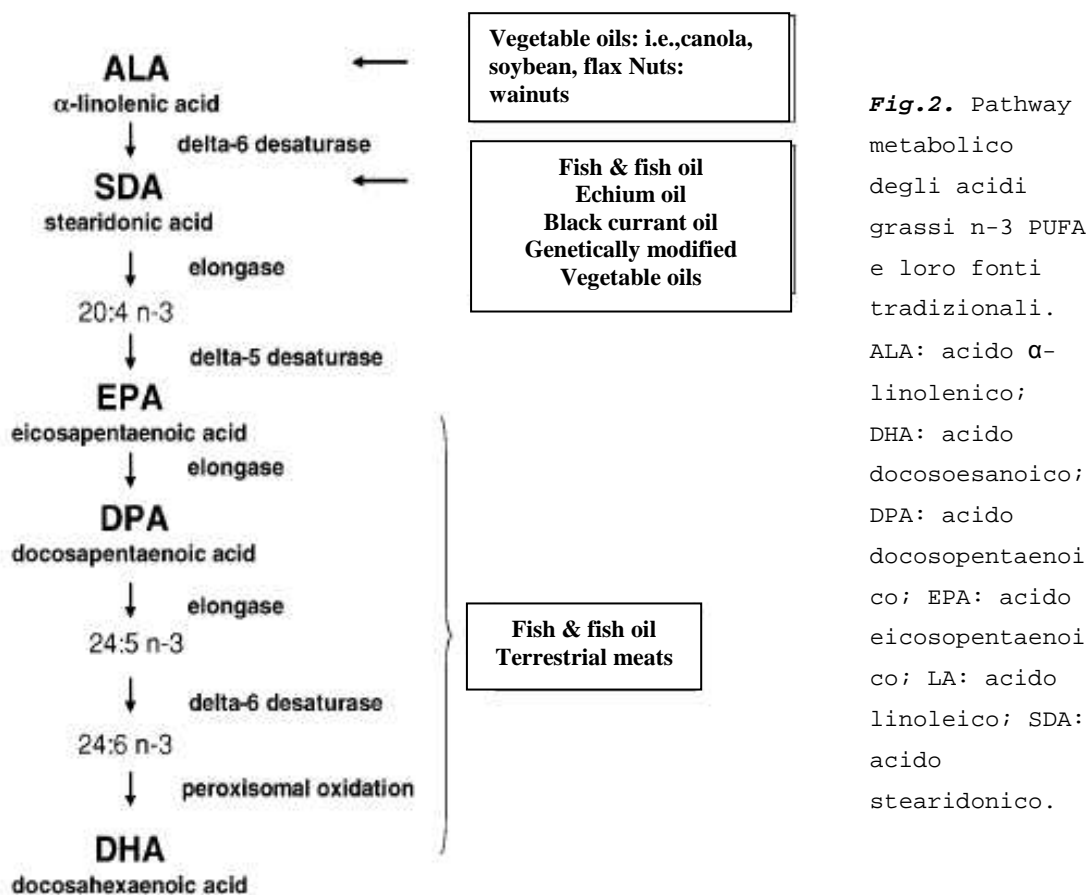
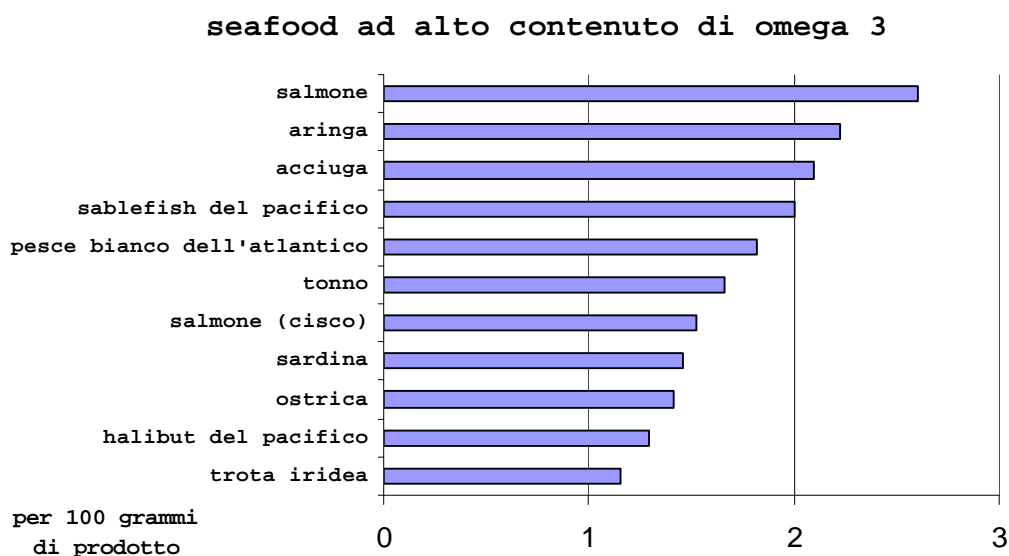


Fig.2. Pathway metabolico degli acidi grassi n-3 PUFA e loro fonti tradizionali. ALA: acido α-linolenico; DHA: acido docosoesanoico; DPA: acido docosopentaenico; EPA: acido eicosopentaenico; LA: acido linoleico; SDA: acido stearidonico.

La maggior parte dei dati pubblicati a proposito, conviene nel sostenere che la conversione di ALA in EPA sarebbe un processo adeguato nell'uomo mentre, nel caso del DHA, è da prevedere l'integrazione della dieta con DHA preformato, soprattutto in alcune fasi fisiologiche particolari come durante lo sviluppo perinatale. Altri studi ritengono che, invece, in soggetti sani l'efficienza di conversione del precursore ALA negli omega-3 più complessi, EPA e DHA per esempio, sarebbe sempre solo circa uguale al 6% e al 4%, rispettivamente (Stam W., 2003). Ciò nondimeno, tutti i lavori concordano nel pensare che il profilo in acidi grassi ematici di un individuo dipenda sostanzialmente dalla assunzione diretta di omega-3 e di omega-6 più o meno complessi, piuttosto che da processi endogeni di sintesi, e che per questo, i livelli di acidi grassi circolanti varierebbero notevolmente tra popolazioni ed individui con abitudini alimentari differenti. Se si considera poi il normale consumo di pesce di una dieta mediterranea, anche in questo caso, la quota di LC PUFA (long chain polyunsaturated fatty acids), EPA e DHA in primis, sarebbe assimilata in quantità molto ridotte: <0.5g/die rispetto ad un apporto globale di oltre 100g/die di grassi totali (Marangoni et al., 2007).

Tra gli omega-6 essenziali, l'acido linoleico (LA) è presente nei cereali, nelle uova, nel pollame, nella maggior parte degli olii vegetali, nei prodotti da forno e nei semi di grano, nella margarina e nei semi di girasole, oltre che in altri prodotti. L'acido gamma-linolenico (GLA: C18:3n-6) è presente negli oli di enagra, di semi di borragine, nell'olio di semi di ribes nero, oltre che in alcune fonti fungine, mentre il diomo-GLA (DGLA: C20:3n-6) si trova nel fegato, nei testicoli, nelle ghiandole surrenali e nei reni. L'ARA infine, è presente nella carne, nel tuorlo d'uovo, in alcune alghe e nei gamberi (Ollis T.E et al., 1999).

Il latte materno contiene caloricamente circa un 6% di proteine, circa un 41% di glucidi e almeno una quantità pari al 53% di lipidi (con tasso di colesterolo elevato). E' particolarmente ricco di acidi grassi essenziali come il GLA (contenuto fra lo 0.3-1.0%), DGLA, AA, EPA e DHA (questi ultimi in quantità più moderate) (Ollis TE et al., 1999).



Composizione percentuale in acidi grassi degli oli vegetali

	acido palmitico (C16:0)	acido stearico (C18:0)	acido oleico (C18:n1,9)	acido linoleico (C18:n2,6)	acido linolenico (C18:n3,3)
olio di oliva	11.5	2.5	74	9.5	1
olio di colza	4.5	1.5	56	21	10
olio di sesamo	8.5	4.5	42	44	0.5
olio di soia	10	4	21	56	8
olio di semi di cotone	25	2.5	18	52	0.5
olio di mais	11.5	2.5	32.5	52	1
olio di girasole	6.5	5	24	63	0.5
olio di cartamo	6	2.5	13	-	0.5

Fig.3 e Tab.1. Nella figura 3 vi è una lista che indica quali sono i pesci di mare che hanno maggior contenuto di omega-3 accumulati nelle loro carni. Mentre nella tabella 1 sono riportati gli acidi grassi più presenti negli oli vegetali e la loro composizione percentuale.

Occorre tener presente che tutti gli EFA, se sottoposti ad alte temperature e idrogenazione (ad esempio durante il processo di lavorazione degli alimenti) vengono denaturati e convertiti in acidi grassi trans, dannosi, questi, per l'organismo.

Un' eventuale deficienza alimentare di EFA si manifesta attraverso sintomi quali secchezza e desquamazione della pelle, epatosplenomegalia, immunodeficienza, sudorazione eccessiva, disidratazione, dermatiti al cuoio capelluto, alopecia e depigmentazione dei capelli.

Alla luce delle considerazioni fatte è logico capire i motivi per cui oggi è così forte la richiesta di individuare e sviluppare fonti, anche non convenzionali, che possano integrare la nostra alimentazione con quantità apprezzabili di omega-3, in generale, ma soprattutto di EPA e di DHA.

Gli omega-3 degli oli di pesce naturali sono disponibili in forma di trigliceridi (TG). I preparati farmaceutici propongono, invece, questi composti come concentrati di estere etilico, una forma sintetica ottenuta chimicamente. Se si fa una ricerca in letteratura sulla biodisponibilità degli omega-3 LC PUFA dopo consumo di pesce vs somministrazione di preparati farmaceutici, si vedrà che l'assorbimento di EPA e di DHA è apprezzabilmente più elevato (rispettivamente del 40% e del 48%) se si ingeriscono omega-3 tramite consumo diretto di pesce o ingerendo olio di pesce naturale.

Attualmente vi è da parte del mercato mondiale un'offerta ricca e competitiva, forse anche confusionaria, di prodotti chiamati "olio di pesce". Si sappia che il termine "olio di pesce naturale" è sinonimo del fatto che nessun prodotto chimico sintetico è stato utilizzato o aggiunto durante il processo di produzione e che gli acidi grassi omega-3 sono rimasti nel loro stato naturale, sotto forma, appunto, di trigliceridi.

Una delle ragioni che può spiegare la debole biodisponibilità della forma in estere etilico sintetica deriverebbe dalla maggiore resistenza di questi agli enzimi digestivi.

Nel corso della digestione, la lipasi pancreatica idrolizza l'olio per liberare gli acidi grassi, stadio che preparerebbe ad un assorbimento ulteriore degli stessi. E' stato dimostrato che la forma in estere etilico risulta da 10 a 50 volte più resistente ai processi enzimatici rispetto a quella del trigliceride (Lawson LD et al. 1988; Beckermann B et al., 1990).

I trigliceridi sono i lipidi più abbondanti di origine naturale, e costituiscono i grassi animali e gli oli vegetali. Servono soprattutto come deposito di energia prodotta e immagazzinata a livello di tessuto adiposo (grasso sottocutaneo). Un trigliceride è un lipide costituito da una molecola di glicerolo a cui sono legati 3 acidi grassi. Il glicerolo (1,2,3 propantriolo) è un alcol con tre atomi di carbonio, ciascuno con un gruppo ossidrilico, mentre l'acido grasso è formato da un gruppo carbossilico e da una catena idrocarburica. I 3 acidi grassi sono uniti a una molecola di glicerolo per esterificazione, grazie ai gruppi ossidrilici del glicerolo. Spesso i 3 acidi grassi sono differenti.

Gli acidi grassi sono i lipidi più semplici e comuni, e possono differire per la lunghezza e/o il tipo di legame tra gli atomi di carbonio, legami, che possono essere tutti singoli, e allora si parla di acidi grassi saturi, oppure no, e in questo caso si parla, appunto, di acidi grassi insaturi. Sono stati isolati, da varie cellule e tessuti, più di 500 tipi di acidi grassi, e si può notare che quasi sempre hanno un numero pari di atomi di carbonio, solitamente compreso tra 12 e 20.

Gli acidi grassi insaturi, in configurazione cis, creano una curva. Le curva degli acidi grassi insaturi impediscono alle molecole di compattarsi saldamente e di solidificare a temperatura ambiente. La maggior parte dei grassi vegetali è

composta da oli insaturi, mentre la maggior parte dei grassi animali è satura.

I lipidi ingeriti con gli alimenti hanno un altissimo contenuto energetico e, nell'ambito dei tre gruppi di macromolecole che compongono gli elementi nutritivi per la cellula: grassi (o lipidi), zuccheri (o glucidi), proteine (o protidi), sono quelli in grado di sviluppare durante il catabolismo, la massima quantità di energia. Negli animali e nell'uomo, il principale utilizzo del grasso è come riserva energetica per il corpo e come isolante termico.

Da un punto di vista chimico, i lipidi (olii, grassi ecc.) sono biomolecole eterogenee con marcata lipofilia (idrofobia). Si distinguono in lipidi idrolizzabili - quelli esterizzati con acidi grassi (come i trigliceridi, le cere, gli steroli, i fosfolipidi, i glicolipidi), che sono decomponibili con enzimi esterasi - e lipidi non idrolizzabili. Questi, sono alcoli alifatici a lunga catena o steroli ciclici come il comune colesterolo, gli steroidi, gli acidi grassi e tutti i loro derivati (ad esempio gli eicosanoidi), infine a questa categoria appartengono anche carotenoidi e terpeni.

L'assorbimento dei lipidi nell'uomo

I lipidi introdotti con gli alimenti, hanno una composizione variabile e possono essere ingeriti in forma di gliceridi, steroidi, fosfolipidi, vitamine liposolubili, o altro. Tuttavia, le molecole lipidiche più abbondanti negli alimenti, fonte principale di energia per il nostro organismo, sono i trigliceridi.

I lipidi, a differenza dei carboidrati, passano imm modificati attraverso la bocca e lo stomaco e solo quando arrivano nel duodeno inizia la loro digestione. Poiché si tratta di sostanze idrofobe, il primo problema che l'organismo deve affrontare perché avvenga la loro trasformazione in molecole più semplici, è quello di fare in modo che gli enzimi

digestivi, dispersi nel mezzo acquoso, possano adeguatamente legarsi ad essi. Ciò diventa possibile per azione dei sali biliari secreti dalla bile proveniente dalla cistifellea, le cui proprietà detergenti fanno sì che la lipasi giunga a contatto con i lipidi insolubili in acqua e si possa ottenere la loro scissione in monogliceridi e acidi grassi.

La bile contiene oltre agli acidi biliari che nel duodeno si trasformano immediatamente nei rispettivi sali, anche colesterolo, fosfolipidi, pigmenti biliari (prodotti di demolizione di porfirine come l'eme). La funzione dei sali biliari è anche quella di neutralizzare l'acidità gastrica (pH=2) e rendere quindi attivi gli enzimi intestinali che hanno un pH ottimale intorno a 7. Contemporaneamente, dai dotti pancreatici viene secreta la prolipasi, proenzima, che attivata a lipasi proprio dall'azione dei sali biliari e da una proteina specifica (colipasi), idrolizza i legami estere tra il glicerolo e gli acidi grassi nelle posizioni 1 e 3, dando origine a un 2-monogliceride e ai sali sodici degli acidi grassi idrolizzati anche detti saponi.

L'idrolisi metabolica di un trigliceride viene chiamata lipolisi. I 2-monogliceridi possono essere assorbiti direttamente (circa il 70%) o subire l'azione di una isomerasi che sposta l'acido grasso dalla posizione 2 alla posizione 1. In questo modo il prodotto dell'azione enzimatica può subire l'azione della lipasi e generare glicerolo libero che viene assorbito per diffusione.

La produzione progressiva dei sali degli acidi grassi e di 2-monogliceridi (anch'essi agenti tensioattivi) rende l'emulsione sempre meno grossolana e la digestione via, via più facile.

L'assorbimento degli acidi grassi avviene quasi esclusivamente nel tratto dell'intestino tenue chiamato digiuno e il passaggio dentro le cellule della mucosa avviene per semplice diffusione. All'interno delle cellule della mucosa gli acidi grassi sono risintetizzati in trigliceridi dagli enzimi del reticolo endoplasmatico, con consumo di energia e formazione

di chilomicroni (complessi lipoproteici- VLDL- costituiti da trigliceridi, fosfolipidi, colesterolo e proteine). Questi aggregati molecolari sono il mezzo di trasporto usato dai trigliceridi per muoversi nella linfa e nel sangue. I sali biliari utilizzati per emulsionare i trigliceridi, ma anche gli altri lipidi, vengono riassorbiti nell'intestino e riportati al fegato, che rinviandoli successivamente alla cistifellea, li rimetterà in questo modo di nuovo in circolazione.

I trigliceridi, diversamente dai carboidrati e dagli amminoacidi, non passano nei vasi sanguigni, ma vengono assorbiti dai vasi linfatici; la linfa assume, per questo, un aspetto lattiginoso e viene chiamato chilo.

Il chilo viene riversato nella vena succlavia avviando i chilomicroni verso il fegato, che, come sempre, è il centro di raccolta e smistamento di qualsiasi molecola abbia un interesse metabolico.

Di rilevante significato dietologico è il fatto che, fra gli acidi grassi insaturi contenuti normalmente nei trigliceridi alimentari, vengono assorbiti molto facilmente quelli naturali (con una isomeria -cis), mentre gli isomeri trans- (presenti soprattutto negli oli di semi in seguito ai trattamenti tecnologici subiti) sono assorbiti molto più lentamente e in percentuali inferiori.

I trigliceridi contenenti acidi grassi a catena corta (MCT, medium chain triglycerides) con un numero di atomi di carbonio da 6 a 12 hanno un assorbimento sostanzialmente diverso da quelli contenenti acidi grassi a catena lunga. Gli acidi grassi MCT non passano attraverso il sistema linfatico, ma giungono direttamente al fegato attraverso i vasi mesenterici e la vena porta, dopo essere stati completamente idrolizzati dalla lipasi pancreatica.

Infine, ricordiamo che si può avere malassorbimento di lipidi per maldigestione, dovuta a deficit o carenza di enzimi di provenienza biliare e pancreatica, oppure per deficit di

assorbimento o di trasporto, dovuto questo ad alterazioni del drenaggio linfatico intestinale (M Wipple, Linfangectasia).

Funzioni biologiche degli EFA

Negli ultimi anni sono stati condotti vari studi sia sperimentali su modelli animali sia clinici intesi a dimostrare i numerosi effetti benefici dei PUFA n-3. Il primo effetto biologico individuato è stato quello ipotrigliceridemizzante, per cui tali composti sono stati inizialmente utilizzati per il trattamento delle dislipidemie. Successivamente sono stati evidenziati gli effetti antiaggregante, antiaterotrombotico e, di recente, quello antiaritmogeno.

Gli EFA/PUFA agiscono a diversi livelli sull'organismo umano e il complesso delle loro attività si può così schematizzare:

✓ azione sulla fluidità delle membrane cellulari

La fluidità delle membrane è determinata dalla loro composizione lipidica: un aumento nell'incorporazione di acidi grassi saturi e colesterolo ne aumenta la rigidità. Al contrario, l'incorporazione di acidi grassi insaturi e a lunga catena favorisce la fluidità dello strato fosfolipidico, il numero di recettori, la loro affinità per i rispettivi ormoni e fattori di crescita. La rigidità delle membrane riduce, invece, il numero e l'affinità dei recettori per i propri ligandi come accade per quelli dell'insulina, dove un aumento nell'incorporazione di acidi grassi saturi può tradursi in resistenza all'ormone, mentre una maggiore fluidità della membrana porta all'aumento del numero e dell'affinità dei recettori per l'insulina, diminuendone la resistenza.

Tenendo conto del ruolo centrale dell'insulinoresistenza nello sviluppo del diabete, alcuni studi hanno voluto verificare come i PUFA n-3 potessero influenzare l'azione dell'insulina a livello dei corrispondenti recettori. Nel ratto è stato evidenziato che un'aumentata concentrazione di omega-3

migliora la fluidità di membrana e quindi l'interazione tra l'insulina e il suo recettore (Montori VM *et al.*, 2000). Tutto questo, però, non è stato dimostrato ancora nell'uomo su cui in letteratura sono presenti dati discordanti, anche se dalle ultime pubblicazioni sembrerebbe che la somministrazione di PUFA n-3 fino a 3 g/die è sicura ed ha effetto neutro sia sull'emoglobina glicata sia sulla glicemia a digiuno.

La crescita e lo sviluppo del cervello durante il periodo perinatale e l'adolescenza, è fortemente condizionata dalla disponibilità di acidi grassi ω -3 e ω -6. Infatti, se questa risultasse insufficiente potrebbe essere compromesso il formarsi di adeguate connessioni sinaptiche che, porterebbero al definirsi di condizioni neuropsicologiche gravi, come demenza, depressione, schizofrenia, Alzheimer e/o a malattie neurodegenerative quali corea di Huntington, morbo di Parkinson, degenerazione spino cerebrale ed altro.

✓ **Effetto antitrombotico ed emoreologico**

Dopo appropriata stimolazione, i PUFA vengono liberati dalle membrane cellulari e, per opera degli enzimi cicloossigenasi e lipoossigenasi, danno origine a metaboliti attivi, detti eicosanoidi (prostaglandine, trombossani, leucotrieni e altri prodotti biologicamente attivi).

Gli acidi grassi possono quindi intervenire in diversi processi biologici, e spesso con azioni anche opposte tra loro.

Come schematicamente rappresentato in *figura 4* dall'acido arachidonico derivano il trombossano della serie A2 (TXA2), i leucotrieni della serie 4 (LTB4, LTC4, ecc.) e le prostaglandine della serie 2 (PGI2, PGD2, ecc.) formati rispettivamente nelle piastrine, nei leucociti e nelle cellule endoteliali. L'EPA viene metabolizzato, nelle stesse sedi, a trombossano A3 (TXA3), leucotrieni della serie 5 (LTB5, LTC5, ecc.) e prostaglandine della serie 3 (PGI3, PGD3, ecc.).

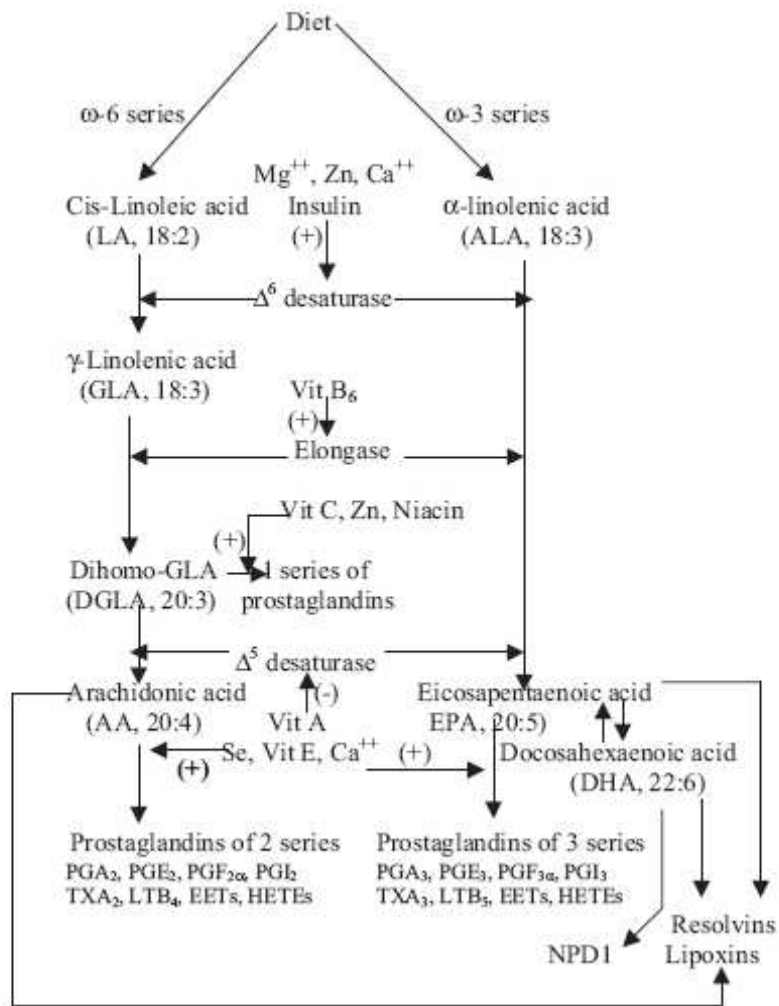


Fig.4. Metabolismo degli EFA e cofattori che aumentano l'attività delle desaturasi Δ -5 e Δ -6, delle elongasi e la formazione delle PGs. (+) indica l'aumento delle attività enzimatiche o incremento della formazione del prodotto, (-) ne indica l'inibizione o il decremento.

Mentre gli effetti vasodilatanti e antiaggreganti delle prostaglandine della serie 2 e 3 sono considerati equivalenti, il TXA₂ e i leucotrieni della serie 4, derivati dall'acido arachidonico, hanno rispettivamente un effetto proaggregante/vasocostrittore e proinfiammatorio complessivamente superiori agli analoghi eicosanoidi derivati dall'EPA 3.

Nella dieta dei paesi occidentali, gli acidi grassi polinsaturi presenti in maggior quantità sono gli omega-6.

Infatti, in tali regimi alimentari il rapporto omega-6:omega-3 è attualmente di circa 20:1, mentre sarebbe ottimale un rapporto compreso tra 3:1 e 5:1 (comunque non oltre 6:1). Un'aggiunta di omega-3 alla dieta induce un parziale rimpiazzo degli omega-6 nelle membrane cellulari da parte degli omega-3. La maggiore assunzione di PUFA n-3 determinerebbe uno shift nella sintesi degli eicosanoidi per sostituzione a livello delle membrane cellulari dell'acido arachidonico con l'EPA, come substrato dello stesso sistema enzimatico. L'ingestione insieme di EPA e di DHA da pesce o olio di pesce induce pertanto (Simopoulous AP, 2006):

- una minore produzione di prostaglandina E2 (PGE₂);
- la riduzione del tromboxano A₂;
- la riduzione della formazione del leucotriene B₄;
- un aumento del tromboxano A₃;
- l'aumento della prostaciclina PGI₃;
- l'aumento del leucotriene B₅.

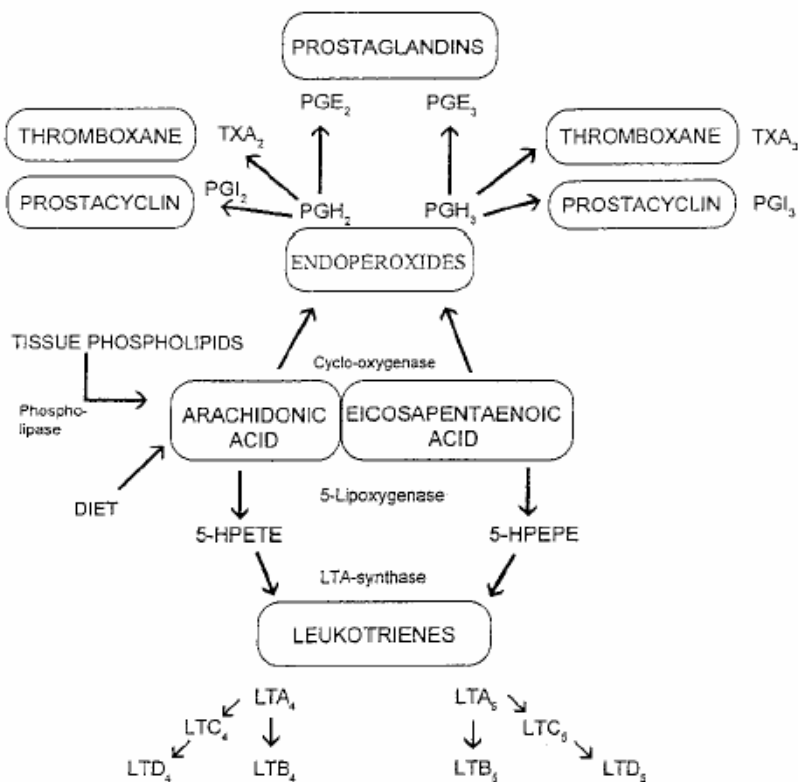


Fig.5. Metabolismo ossidativo dell'ARA e dell'EPA da parte della cicloossigenasi e della 5-lipossigenasi (Simopoulos A.P, 2002).

Questo potrebbe in parte spiegare gli effetti biologici favorevoli dei PUFA n-3 rispetto ai PUFA n-6, anche se probabilmente altri meccanismi sono operanti nel determinare un benefico effetto antitrombotico degli omega-3 polinsaturi, quali:

1. potenziamento della fibrinolisi e riduzione del fibrinogeno;
2. riduzione dell'attività della lipoproteina (a), potente fattore protrombotico oltre che proaterogeno.

I meccanismi elencati in tabella rendono ragione dei positivi effetti svolti dagli acidi grassi poliinsaturi n-3 sull'aggregazione piastrinica, con relativo allungamento del tempo di sanguinamento.

Effetti antitrombotici degli omega-3 polinsaturi	
Riduzione di fattori pro trombotici	Aumento dei fattori antitrombotici
◇ Trombossano A2	◇ Prostacicline I3
◇ Numero di piastrine	◇ Fattore di rilascio endotelio-derivato (EDRF o NO)
◇ Adesione piastrinica	◇ Fibrinolisi
◇ Aggregazione piastrinica	◇ Tempo di emorragia
◇ Fibrinogeno	
◇ Fattore di adesione piastrinica	
◇ Fattore di crescita PDGF	
◇ Lipoproteina (a)	

Tab.2. Meccanismi d'azione antitrombotici controllati dagli omega-3 polinsaturi

È stato infine dimostrato che una maggiore incorporazione dei PUFA n-3 nella membrana cellulare dei globuli rossi è in grado di incrementarne la fluidità e quindi la deformabilità meccanica ed osmotica, favorendone la circolazione a livello del microcircolo.

✓ **Effetti sull'assetto lipidico**

Gli effetti degli acidi grassi PUFA n-3 a carico dei trigliceridi sono stati quelli maggiormente studiati. Si attesta una riduzione media della trigliceridemia attorno al 30% e l'effetto ipotrigliceridemizzante sembra essere dose-dipendente (Mori TA et al., 2001). Il meccanismo alla base vuole una diminuita sintesi epatica di acidi grassi, trigliceridi e VLDL, oltre che un maggiore catabolismo delle VLDL in LDL, dal momento che le VLDL ricche in omega-3 sarebbero più suscettibili all'azione delle lipoproteinlipasi. Di recente è stata anche ipotizzata un'azione sui recettori nucleari PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) (Poli A, 2002).

Molto discussi sono invece gli effetti dei PUFA n-3 sugli altri lipidi. Essi incrementano modestamente i livelli delle HDL grazie alla riduzione degli acidi grassi liberi nel plasma che causerebbe un ridotto trasferimento, mediato dalla Cholesterol Ester Transfer Protein, degli esteri del colesterolo dalle HDL alle LDL e VLDL (Rustan AC et al., 1997).

Molto meno certo è l'effetto degli acidi grassi omega-3 sulle concentrazioni plasmatiche delle LDL. E' stato descritto un modesto aumento di tale frazione lipoproteica da ascrivere ad una maggiore dimensione delle singole particelle piuttosto che ad un loro incremento numerico (Suzukawa M et al., 1995). Si tratta di un effetto antiaterogeno dei PUFA n-3 tenendo conto che solo le LDL piccole e dense sono associate a un maggior rischio aterogeno.

In ultimo, alcuni recenti studi hanno evidenziato che i PUFA n-3 riducono la lipidemia post-prandiale, fattore che sembra avere un ruolo indipendente nello sviluppo dell'aterosclerosi (Nordoy A et al., 2000).

✓ **Effetti sulla pressione arteriosa e sul tono vascolare**

Gli acidi grassi omega-3 riducono la pressione arteriosa sia in soggetti sani, sia in pazienti affetti da ipertensione

arteriosa (Bonaa KH et al., 1990) attraverso diversi meccanismi:

- soppressione di prostanoidi ad azione vasocostrittrice;
- incrementata produzione e rilascio di eNO (ossido nitrico endoteliale);
- riduzione della concentrazione plasmatica di noradrenalina;
- regolazione dell'accumulo di calcio nella cellula;
- aumentata fluidità delle membrane plasmatiche.

✓ **Azione come inibitori della sintesi di citochine proinfiammatorie**

Gli omega-3 hanno la capacità di sopprimere la produzione di citochine (IL-1, IL-2, IL-6 e TNF) sintetizzate dalle cellule T infiammatorie. Alcuni degli effetti benefici associati ai PUFA nei processi infiammatori, derivano dalla loro capacità di sollecitare, invece, la formazione di composti anti-infiammatori, quali lipossine, resolvine e la neuroprotectina D1 inoltre, come già detto in precedenza, dagli acidi grassi omega-3 derivano i leucotrieni della serie 5, che rispetto a quelli della serie 4 (derivati dall'acido arachidonico), sono dotati di un'azione vasocostrittrice e pro-infiammatoria molto più modesta. Ciò può comportare importanti ricadute sia sull'aterosclerosi sia su altre patologie infiammatorie (artrite reumatoide, morbo di Crohn, psoriasi, dermatite atopica).

Essendo ormai universalmente accettato il ruolo svolto dall'infiammazione nella genesi della placca aterosclerotica e nelle condizioni di instabilità e rottura della stessa è verosimile pensare che gli acidi grassi omega-3, mediante l'attenuazione dei processi infiammatori, possano svolgere un ruolo centrale nella prevenzione sia del processo aterosclerotico sia degli eventi acuti connessi alla rottura della placca.

✓ **Effetti antiaterotrombotici**

Diversi studi hanno ampiamente dimostrato come la disfunzione endoteliale indotta da molteplici fattori quali tossine, shear stress, fumo di sigaretta e dislipidemia, sia l'evento iniziale nello sviluppo dell'aterosclerosi. L'endotelio diventa "pro-adesivo" inducendo un'aumentata adesività dei monoliti circolanti che successivamente infiltrano l'intima della parete arteriosa. A questo livello formano la stria lipidica, primo evento morfologicamente rilevabile nell'aterosclerosi (Ross R, 1990).

Diversi sono i fattori che mediano l'interazione endotelio-leucociti, quali alcune chemochine, e nell'evoluzione da stria lipidica a placca aterosclerotica sono anche implicate numerose citochine. Le placche instabili sono quelle particolarmente ricche in lipidi e a maggior rischio di fissurazione. Queste rappresentano l'ultimo stadio evolutivo dell'ateroma che porta fra le altre cose all'infarto e a tutte le complicanze correlate ad esso, prima fra tutte l'insorgenza di aritmie fatali.

E' stato ampiamente dimostrato che i PUFA n-3 si inseriscono positivamente all'interno dei meccanismi patogenetici dell'aterosclerosi grazie ai loro effetti ipolipemizzanti, antitrombotici, emoreologici e sull'attivazione endoteliale. Questi si avrebbero per merito di una ridotta produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL6, TNF α), di proteina ed mRNA del PDGF- α e - β (potente piogeno e chemochina per le cellule muscolari lisce), nonché una ridotta espressione di molecole endoteliali di adesione, ed un aumentato rilascio di nitrossido da parte dell'endotelio.

Questi effetti sono tutti correlabili all'incorporazione dei PUFA n-3 (in particolare di DHA) nelle membrane cellulari, mentre sono inversamente proporzionali al contenuto di PUFA n-6.

Il DHA si concentrerebbe maggiormente nel pool di fosfatidiletanolamina, che è notoriamente più rappresentato nella parte interna della membrana plasmatica, ossia, in una posizione

strategica per alterare e controllare le vie di trasduzione del segnale intracellulare (De Caterina R *et al.*, 1995).

Infine i PUFA n-3 inibiscono il fattore di trascrizione nucleare NF- κ B che controlla l'espressione coordinata di diverse molecole di adesione e chemotattiche, specifiche per i leucociti (Collins T *et al.*, 1995).

I fattori riportati contribuiscono sicuramente alla stabilità della placca e potrebbero giustificare quindi la riduzione di eventi cardiovascolari fatali e non fatali osservata negli studi clinici di prevenzione primaria e secondaria con PUFA n-3 (Thies F *et al.*, 2003).

✓ **Effetti antiaritmogeni**

Gli acidi grassi poliinsaturi n-3, nati come farmaci da utilizzare nel controllo delle dislipidemie, hanno imprevedibilmente dimostrato un'efficacia antiaritmica, rappresentando una nuova opzione farmacologica nel trattamento delle aritmie ventricolari e quindi della Morte Cardiaca Improvvisa (MCI) nei pazienti affetti da cardiopatia post-infartuale.

I meccanismi ipotizzati nell'indurre una maggiore stabilità elettrica di membrana da parte dei PUFA n-3 sarebbero molteplici.

Anzitutto, la produzione di eicosanoidi meno dannosi (TXA₃ e LTB₅) determina una minore risposta vasocostrittrice e infiammatoria tessutale e quindi una riduzione del rischio di infarto che si concretizza anche attraverso una minore produzione di radicali superossido che normalmente favoriscono l'instabilità elettrica delle aree perinfartuali.

Studi condotti mediante l'analisi della variabilità della frequenza cardiaca (HRV), hanno documentato come la somministrazione di PUFA n-3 determini un aumento della variabilità della stessa sia in pazienti ad elevato rischio aritmico (pazienti infartuati, pazienti con insufficienza renale cronica e in dialisi, pazienti diabetici) (La Rovere MT *et al.*, 1998; Christensen JH *et al.*, 2001), sia in soggetti

sani, e come questo sia correlato con le concentrazioni di EPA e DHA nelle membrane cellulari piastriniche.

I PUFA n-3 agiscono modulando la conduttanza dei canali ionici di membrana del Na⁺⁺ e del Ca⁺⁺, attraverso la modificazione dello stato fisico e, quindi, delle caratteristiche di fluidità del doppio strato lipidico. Un meccanismo recentemente ipotizzato sarebbe rappresentato da un'alterazione della tensione che i fosfolipidi di membrana esercitano sul canale stesso, con conseguente cambiamento conformazionale e alterazione della conduttanza ionica (Leaf A et al. 2002).

Questi effetti sui canali ionici di membrana sono stati testati in una serie di lavori sperimentali condotti prevalentemente su miociti isolati trattati con sostanze aritmogene. Analogamente, studi condotti in vivo, hanno evidenziato un effetto protettivo dei PUFA n-3 contro le aritmie ventricolari fatali indotte dall'ischemia (Bilman GE et al., 1999).

✓ ***I PUFA n-3 e le Dislipidemie***

Come già detto sono ormai numerosi i trials basati sulla dieta mediterranea che hanno dimostrato gli effetti benefici dell'assunzione di pesce sull'assetto lipidico e sul rischio cardiovascolare. In particolare, è stato dimostrato che per ottenere una riduzione della trigliceridemia di almeno il 30% è necessario assumere dai 120 ai 320 grammi al giorno di pesce.

Gli integratori presenti in commercio, che contengono una quantità titolata di PUFA n-3, consentono l'assunzione terapeutica dai 3 ai 4 grammi/die, dose ritenuta efficace per una riduzione adeguata dei trigliceridi nel sangue, come si dimostra in una review degli studi condotti sull'uomo (Harris WS, 1997). E' stato osservato che una dose media di circa 4 g/die riduce di circa il 20-25% la trigliceridemia e che esiste una stretta relazione dose-risposta.

Attualmente, l'uso dei PUFA n-3 è indicato nel trattamento delle forme severe di ipertrigliceridemia e nella dislipidemia secondaria ad insufficienza renale cronica. In questi pazienti, l'impiego di altri ipolipemizzanti è limitato dalla presenza di un'alterata funzione renale, mentre i PUFA n-3, efficaci sull'assetto lipidico, non presentano effetti collaterali (Ando M *et al.*, 1999).

✓ ***I PUFA n-3 e la Morte Improvvisa***

I dati degli studi osservazionali condotti su popolazioni con elevato consumo di pesce grasso (come gli esquimesi, i pescatori delle coste giapponesi, ecc.) hanno messo in evidenza una riduzione della mortalità cardiovascolare e degli eventi ischemici non fatali legati evidentemente all'elevata introduzione dietetica di PUFA n-3.

I risultati dell'US Physicians' Health Study hanno dimostrato come in soggetti liberi da patologia cardiovascolare, l'assunzione di pesce almeno una volta alla settimana era associata ad una riduzione del 52% del rischio di morte improvvisa e del 30% di mortalità totale, mentre nessuna variazione significativa era stata osservata per l'IMA (Infarto Miocardico Acuto) non fatale o per la morte non improvvisa (Albert CM *et al.*, 1998).

Sulla base delle evidenze attualmente disponibili, i PUFA n-3, trovano impiego nella prevenzione non solo secondaria, ma anche primaria della cardiopatia ischemica e della morte cardiaca improvvisa (Albert CM *et al.*, 2002; Hu FB *et al.*, 2002). Per esempio il Lyon Diet Heart è uno studio di prevenzione secondaria, che ha evidenziato l'effetto benefico della dieta di tipo mediterraneo rispetto a quella di tipo "americano", con una significativa riduzione di tutti gli endpoint considerati (morte cardiaca e infarto miocardico non fatale, morte cardiaca e infarto miocardico fatale più angina instabile, ictus, scompenso cardiaco, embolia polmonare e

periferica, tutti gli eventi precedenti più un ricovero ospedaliero) (de Lorgeril M *et al.*, 1999).

Lo studio Indian (Singh RB *et al.*, 1997) ha invece dimostrato che la somministrazione precoce di PUFA n-3 (entro 18 ore dal ricovero), attraverso olio di pesce o di mostarda, ha un effetto protettivo nei pazienti con infarto miocardico acuto.

La riprova dell'azione antiaritmogena di tali sostanze ci è stata fornita dallo studio GISSI-Prevenzione (Marchioli R *et al.*, 2001; Marchioli R *et al.*, 2002) dove sono stati arruolati 11.324 pazienti reduci da un recente IMA, randomizzati in 4 gruppi per ricevere in aggiunta alla terapia tradizionale: 1 g/die di PUFA n-3 (EPA + DHA 850 mg); 300 mg/die di vitamina E; entrambi i trattamenti; nessun trattamento in esame.

In particolare, è stata rilevata nel gruppo PUFA n-3 trattato con bassi dosaggi di farmaco, una riduzione significativa della mortalità totale (20%), della mortalità cardiovascolare (30%) e della morte improvvisa (45%) (*figura 6*), sottolineando in accordo con i precedenti studi, un effetto protettivo diretto dei PUFA n-3 sul miocardio, anche indipendentemente dagli effetti antitrombotico e antiaterogeno dei PUFA n-3.

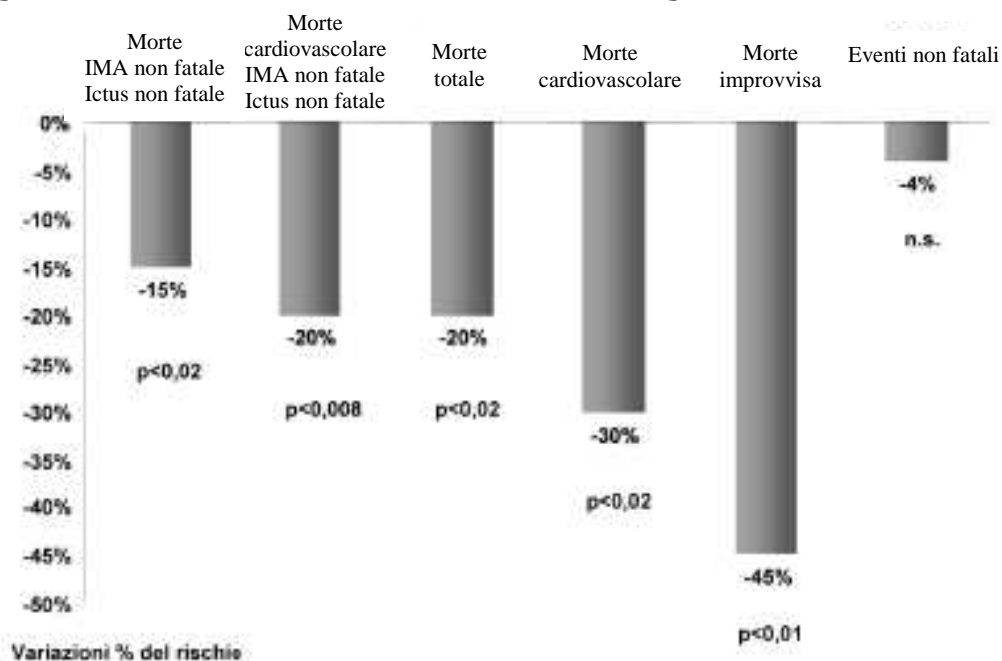


Fig.6. Effetti sulla sopravvivenza indotti dal trattamento con PUFA n-3 in pazienti infartuati. GISSI-Prevenzione (Marchioli *et al.*, *Circulation* 2002;105:1897-903, mod.).

Analizzando il beneficio ottenuto in termini di vite salvate, su 1.000 pazienti trattati all'anno, in confronto con altri trattamenti raccomandati come le statine, appare evidente l'efficacia del trattamento con PUFA n-3 nella prevenzione secondaria della cardiopatia ischemica: 5,7 su 1.000 pazienti all'anno con PUFA n-3 vs. 5,2 su 1.000 pazienti all'anno con le statine. In tal senso, fra i farmaci cardiovascolari è da sottolineare come solo i β -bloccanti nello scompenso cardiaco si siano dimostrati superiori ai PUFA n-3 ed alle statine relativamente al numero di soggetti da trattare all'anno per salvare una vita (Bucher HC et al., 2002).

A conferma del crescente interesse scientifico e terapeutico intorno agli omega-3 altamente insaturi, le Linee Guida Dietetiche dell'American Heart Association (Penny M. et al., 2002) includono fra le raccomandazioni per la prevenzione secondaria del post-IMA l'assunzione di 1 grammo/die di PUFA n-3, estendendo l'indicazione all'assunzione di PUFA n-3 in forma alimentare o di estratto purificato farmacologico, anche a soggetti senza documentata coronaropatia (tabella 3).

Popolazione	Raccomandazioni
Pazienti senza documentata CHD	Assumere pesce grasso almeno due volte alla settimana. Includere olii e cibi ricchi di acido ALA (olio di lino e soia, semi di lino e noci)
Pazienti con documentata CHD	Consumare circa 1g di EPA + DHA al giorno, preferibilmente provenienti da pesce grasso. Eventuale assunzione di supplementi di EPA + DHA in base a consiglio medico
Pazienti che necessitano di ridurre i livelli di trigliceridemia	Da 2 a 4 g di EPA + DHA al giorno, assunti in capsule, sotto controllo medico

Tab. 3. Raccomandazioni dell'AHA per l'assunzione di PUFA n-3 in termini di prevenzione primaria e secondaria (Kris-Etherton et al., Circulation 2002;106:2747-57, mod.).

Il trattamento con PUFA n-3 è incluso anche tra le raccomandazioni per la prevenzione primaria della Morte Cardiaca Improvvisa nel post-IMA e nella prevenzione

secondaria del post-infarto nel report della Task force della Società Europea di Cardiologia sulla Morte Cardiaca Improvvisa (Priori SG et al., 2002; Van de Werf F et al., 2003).

Source	Date	n-6:n-3 ratio	Specific recommendations: % en= % of daily energy intake
National Nutrition Council of Norway	1989	none	0.5 % en w-3 lcpufa* (1-2g/day)
NATO Workshop on w-3/w-6	1989	none	0.8g/day EPA/DHA (0.27%en)
Scientific Review Committee of Canada	1990	5:1-6:1	w-3 at least 0.5 %en
British Nutrition Foundation Taskforce	1992	6:1	EPA 0.2-0.5%en:DHA 0.5 %en
FAO/WHO Expert Committee on Fats and Oils in Human Nutrition	1994	5:1-10:1	Consider pre-formed DHA in pregnancy
UK Committee on Medical Aspects of Food Policy (COMA)	1994	none	Fish twice/wk, one of which should be oily, min intake EPA/DHA 200mg/day
Ad Hoc Expert Workshop organised by ISSFAL	2000	none	EPA+DHA 0.3%en; 0.65g/day min
Eurodiet Conference, University of Crete	2000	none	200mg w-3 lcpufa/day
France: AFFSA, CNERNA & CNRS	2001	5:1	500mg w-3 lcpufa/day; DHA 120mg minimum
Health Council of the Netherlands	2001	none	200mg w-3 lcpufa/day "adequate" intake
US National Academy of Sciences/Institute of Medicine	2002	none	130-260mg EPA + DHA/day
American Heart Association ³	2002	none	if no CHD, eat (oily) fish 2x/wk; if CHD, consume 1000mg w-3 lcpufa/day; if high triglycerides. take 2-4g per day, under medical supervision.
UK Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN) ²	2004	none	Fish twice/wk, one of which should be oily, min intake EPA/DHA 450mg/day
ISSFAL	2004	none	500mg w-3 lcpufa/day
Australia and New Zealand Government Recommendations	2005	none	610mg w-3 lcpufa/day for men; for women-410mg/day; Linoleic intake 4-10%en; alpha linolenic 0.4-1.0%en
Health Council of the Netherlands ¹	2006	none	to achieve the dietary reference intake of 450 milligrams of n-3 fatty acids from fish a day, it is necessary to eat two portions of fish a week, at least one of them being oily fish (such as salmon, herring or mackerel)".
Superior Health Council of Belgium	2006	none	a minimum of 0.3 en% EPA + DHA for adults

Tab.4. Raccomandazioni internazionali sul consumo giornaliero di n-3 PUFA.

* lcpufa = long chain polyunsaturated fatty acids (Health Council of the Netherlands, 2006; Scientific Advisory Committee on Nutrition, 2004; American Heart Association Nutrition Committee, Circulation, 2002)

Tuttavia, le raccomandazioni sull'assunzione degli acidi grassi omega-3 PUFA non sono uniformi. E queste sono state riassunte nella *tabella 4*.

Se per aumentare l'assunzione di PUFA n-3 è, in generale, preferibile un approccio dietetico, tuttavia, specie per i pazienti con malattia coronarica, è praticamente impossibile raggiungere con la sola dieta la dose raccomandata di 1 grammo al giorno; lo stesso dicasi per i pazienti con ipertrigliceridemia in cui sono consigliate dosi ancora più elevate (da 2 a 4 grammi). In tal caso è consigliata l'assunzione di PUFA n-3 in forma di supplemento farmacologico ad alta concentrazione di EPA e di DHA.

L'impiego di questi preparati presenta alcuni vantaggi, tra cui la certezza del dosaggio somministrato e la maggiore comodità posologica della cura, che riducono la variabilità dell'apporto alimentare di PUFA n-3 e favoriscono la compliance dei pazienti.

Infatti il contenuto di PUFA n-3 nel pesce varia in rapporto al tipo di pesce (grasso vs magro), ma anche a variabili ambientali (pesce di allevamento o di mare, tipo di cottura ed altro).

✓ ***I PUFA n-3 e il Sistema Nervoso***

Lo abbiamo già detto che il cervello umano ha un elevato contenuto in acidi grassi, di cui circa il 35% è costituito da acidi grassi poliinsaturi, fondamentali per il suo normale sviluppo e il mantenimento delle sue funzioni.

Insieme all'acido arachidonico (ARA), l'acido docosaesaenoico o DHA è uno dei principali costituenti delle membrane cellulari dei neuroni: in particolare la loro concentrazione risulta essere elevata a livello sinaptico, dove intervengono nella trasduzione del segnale attraverso l'attivazione della fosfolipasi A2 e di diversi neurotrasmettitori (Hashimoto M *et al.*, 2002).

È stato inoltre dimostrato che il DHA è fondamentale per lo sviluppo delle funzioni cognitive. Da studi condotti in vivo è

risultato che la maggiore assunzione di PUFA n-3 è associata a una più elevata capacità di apprendimento e di memoria rispetto al gruppo di controllo.

In modelli transgenici di ratto, che assumevano con la dieta omega-3 polinsaturi, è stata dimostrata una maggiore densità sinaptica e una riduzione della concentrazione di beta-amiloide, suggerendo un possibile ruolo di quelle sostanze nella prevenzione della malattia dell'Alzheimer e di altri disturbi cognitivi (Calon F et al., 2004).

Infine, bisogna ricordare come le attività benefiche degli omega-3 sul sistema vascolare si debbano estendere anche a livello cerebrale, dove i disturbi del microcircolo si associano a ridotte capacità cognitive e al progredire della demenza, aspetti frequentemente presenti nel paziente anziano. A conferma dell'importante ruolo svolto dagli acidi grassi nelle normali funzioni cerebrali vi è inoltre l'evidenza che soggetti affetti da depressione hanno un minor contenuto di PUFA n-3 nelle membrane plasmatiche degli eritrociti (Peet M et al., 1998), fatto in correlazione diretta con la severità della malattia.

Un aumentato apporto dietetico o farmacologico di PUFA n-3, specie nel paziente anziano che, come è noto, presenta spesso più comorbilità, potrebbe essere indicato per la prevenzione e il trattamento non solo di malattie cardiovascolari ma anche di malattie neurologiche e mentali.

✓ **Azione antibatterica, antivirale ed anti-fungina**

L'acido linoleico è in grado di uccidere colture di *Staphylococcus aureus*, mentre idrolizzati di olio di lino (contenenti sia LA che ALA) inattivano *S. aureus* meticillina-resistente.

L'ALA promuove l'adesione di *Lactobacillus casei* alle mucose favorendo in questo modo la colonizzazione intestinale dei Lattobacilli che, a loro volta, sopprimono la crescita di batteri patogeni come *Helicobacter pylori*, *flexneri* *Shigella*,

Salmonella typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium difficile*, e di *Escherichia coli*.

✓ **Azione anti-mutagenica e anti-cancerogena**

E' ben documentato che certi PUFA, come il GLA, hanno azione anti-mutagenica e anti-cancerogena. Studi di solo qualche anno fa hanno infatti rivelato che mutageni e cancerogeni bloccano le desaturasi $\Delta 6$ e $\Delta 5$ della via metabolica dei PUFA prima della conversione in cellule maligne (Das Un et al., 2006). Un trattamento con GLA si ritiene essere utile per prevenire tali danni.

I PUFA come criterio tassonomico

La composizione microbica degli acidi grassi polinsaturi è un'informazione tassonomica e fisiologica molto valida sul microrganismo in esame, capace di informare anche sulle sue relazioni con microrganismi di altri gruppi o di specie diverse, non deducibili, allo stesso modo, dalle caratteristiche morfologiche. Per questo motivo i dati fisiologici derivanti da un profilo di acidi grassi indagato, possono essere usati in combinazione con le caratteristiche morfologiche per aumentare la specificità di informazione su un dato microrganismo isolato. Un' informazione certamente utile al livello delle sottospecie, laddove le differenze morfologiche sono ben limitate e, talvolta, fuorvianti.

Prodotti alimentari fortificati con n-3 PUFA

Nel settembre del 2004, la Food and Drug Administration (FDA) ha suggerito delle linee guida per l'uso, il consumo e l'etichettatura dei prodotti alimentari tradizionali arricchiti con omega-3. Contemporaneamente la FDA ha "riconosciuto come generalmente sicuri" un certo numero di oli ricavati da pesci (ad esempio da specie di salmone, tonno e acciughe) e da alcune alghe ad alto contenuto di DHA (*Cryptherodinium cohnii*, *Schizochytrium* sp.), consentendo la

fortificazione alimentare con questi prodotti (cfr. sito web della FDA: <http://www.cfsan.fda.gov/~Rdb/OPA-gras.html>).

Gli oli microbici e non, possono essere aggiunti direttamente agli alimenti tradizionali arricchendoli in contenuto di acidi grassi polinsaturi, la cui stabilizzazione, compromessa da un alto indice di insaturazione, è aumentata da processi tecnologici innovativi, prima fra tutti la microincapsulazione. Un prodotto siffatto è il Meg-3® (Ocean Nutrition Canada, Dartmouth, Nova Scotia, Canada), si tratta di una miscela di microcapsule di raffinati oli di pesce (acciughe, sardine, sgombri) con il privilegio di un odore trascurabile. Tuttavia, esistono anche altre strategie ad oggi impiegate per ottenere prodotti arricchiti negli omega-3 desiderati.

Nelle tabelle che seguono vi è una lista di prodotti già commercializzati fortificati con olio di pesce o di origine microbica (per ulteriori informazioni si consulti l'FDA Web site: <http://www.cfsan.fda.gov/rdb/opa-gras.html>). Molti di questi hanno già largo mercato in Paesi come l'Europa, l'Australia, il Canada ed il Sud America. Gli Stati Uniti, sono invece in ritardo riguardo alla commercializzazione di tali alimenti.

Attualmente tre forme principali di omega-3 PUFA sono utilizzate per la fortificazione dei prodotti alimentari: ALA da oli vegetali e oli di pesce, e DHA da alghe oleaginose.

Le tabelle riportate di seguito presentano un campione molto rappresentativo di prodotti fortificati attualmente disponibili, il loro contenuto in n-3 PUFA, e i Paesi in cui sono venduti. Questo elenco non è esaustivo, ma vuole essere piuttosto un'istantanea del mercato attuale; un ampliamento del numero di prodotti fortificati in n-3 PUFA da sviluppare ed introdurre sul mercato è già stato reso noto. Ciò, in risposta alle numerose ricerche sugli omega-3 ad alto grado di insaturazione appoggiate dai recenti annunci della FDA in materia di salute.

Il gruppo italiano della Parmalat è leader nella produzione e commercializzazione di prodotti lattiero-caseari fortificati con omega-3, in tutto il mondo (<http://www.parmalat.com>) in particolare in Europa e Sud America. In generale, i livelli di EPA e DHA per 200 ml di latte fortificato variano da 10 mg a 190 mg, mentre i livelli di ALA in latte ALA-fortificato può essere anche molto alto come 800 mg ALA/200 ml di latte.

TABLE Novel foods as sources for dietary N-3 PUFAs

Food	Serving (g)	ALA (mg)	EPA (mg)	DHA (mg)	Source of information
Bread/pasta Tip Top Up	100	113	8	36	http://www.tipstop.com.au/driver.asp?page=main/brands/1 Sold in Australia in all major supermarkets, corner stores, petrol stations
Barilla PLUS	100	360	-	-	Source of n-3: HiDHA [®] , tuna oil (0.16%) http://www.barillaus.com/PLUS_Omega_3.aspx Sold at: local groceries, Kroger's
Warburton Good Health Loaf for Women	100	-	-	30	Source of n-3: flaxseed http://www.nutraingredients.com Sold at: ASDA and Sainsbury's supermarkets in the United Kingdom
Vans Gourmet Flax Waffles	90	1600	-	-	Source of n-3: source not revealed No longer available http://vanswaffles.com/images/gourmet_pop_ftr.gif Sold at: Kroger's
Vaifleuri Spaghetti	N/A	N/A	N/A	N/A	Source of n-3: flax meal Sold in France
Men's Bread	34	48	-	-	Source of n-3: eggs derived from hens fed linseed oil Provides 20% of French recommendations http://www.frencheadlow.com/nut_men.htm Sold at: natural food markets, health food stores, food cooperatives, retail stores with natural markets. Whole Foods, Wild Oats, Kroger's, and SuperTarget in the "specially bread" refrigerated and frozen section of stores across the United States Source of n-3: organic flaxseed

TABLE (Continued)

Food	Serving (g)	ALA (mg)	EPA (mg)	DHA (mg)	Source of information
MILK					
Leche Omega Extra of Nestle	200 ml	-	-	N/A	http://translate.google.com/translate?hl=en&sl=es&u=http://www.nestle.com.ar/pages/ProductosPack.asp%3FIDProducto%3D285%26IDMarca%3D39&prev=/search%3Fq%3DLeche%2BOmega%2Bof%2BNestle%26hl%3Den%26lr%3D Sold in Argentina
Vitalat Omega 3 Milk	200 ml	-	60	60	Source of n-3: source not revealed http://www.parmalat.com.br/porta/page?_pageid=398.62.135&_dad=portal&_schemat=PORTAL Sold in Brazil, Uruguay, Argentina
Natrel Omega 3	250 ml	300	-	-	Source of n-3: source not revealed www.natrel.ca/english/whatsnew/omega-press.htm Sold at: retail grocery trade throughout Ontario, Quebec, and British Columbia
Neilson Dairy Oh! 1% Milk	250 ml	-	-	10	Source of n-3: flaxseed oil http://www.dairy-oh.com/nutrition.htm Sold at: Loblaws, Zehrs, Fortinos, No Frills, Valu-mart, independent grocers, Sobeys, Price Chopper, selected IGA and Foodlands in Ontario
Neilson Dairy Oh! 2% Milk	250 ml	-	-	10	Source of n-3: dairy cows are fed a unique diet containing DHA
Neilson Dairy Oh! Whole Milk	250 ml	-	-	20	

N-3 PUFAs IN NONTRADITIONAL FOODS

Food	Serving (g)	ALA (mg)	EPA (mg)	DHA (mg)	Source of information
St Ivel Advance with Omega 3—semi-skimmed	250 ml	—	63	—	formula.php">http://www.omega3.co.uk/ome_ga3/page/omega3_product->formula.php Sold at: Waitrose stores and selected Tesco, Sainsbury's, and Morrisons stores in the United Kingdom Source of n-3: omega 3 in an emulsion format (containing sardine oils)
St Ivel Advance with Omega 3—whole	250 ml	—	113	—	Sold in United Kingdom
Mark & Spencer's Super Whole Milk	250 ml	—	48	—	Source of n-3: fish oils incorporated into cow feed Sold in Ireland
Dawn Omega Milk Lowfat	250 ml	—	25	—	Source of n-3: DSM's ROPUEFA '30'
Whole Milk Candia	250 ml	—	50	—	Sold in France
	250 ml	—	190	—	Source of n-3: source not revealed
Primevere Sterilized Drink	250 ml	210	—	47.5	Sold in France
So Good Fortified Soy Omega Vanilla Eggs	250 ml	1000	—	—	Source of n-3: colza and fish oils Sold in Vancouver, B.C. Source of n-3: flaxseed oil
Gold Circle Farms Eggs	50	—	—	150	http://www.goldcirclefarms.com/products/o3_eggs.html Sold at: primarily sold at health food stores Source of n-3: hens fed a special DHA-rich diet, a patented feed protocol
Stonegate	58	—	—	100	Sold at: Waitrose groceries, Sainsbury, Ocado, and ASDA in the United Kingdom Source of n-3: Nu-Mega's DHA-rich tuna oil

(Continued)

TABLE (Continued)

Food	Serving (g)	ALA (mg)	EPA (mg)	DHA (mg)	Source of information
Christopher Eggs, Columbus (U.K.)	50	600	—	—	Sold at: 500 Wal-Mart Supercenters in 13 South-Central and Midwestern states Source of n-3: "patented, natural, all-vegetarian feed for hens"
Eggs Plus by Pilgrim's Pride	50	100	—	100	Sold at: grocery stores in Texas, Oklahoma, and Arkansas Source of n-3: add flaxseed and fish oil to the feed with an additional supplement of vitamin E http://www.born3.com/b3_eggs.htm#anchor1323509
Born 3 Eggs	50	400	—	—	Sold in British Columbia, Canada Source of n-3: flaxseed
Omega Pro Liquid Eggs	100	—	149	144*	Sold at: Food Lion, Albertson's, Wal-Mart Supercenters, Whole Foods, Canada Source of n-3: menhaden oil* 30mg DPA included http://www.countryhen.com/order.php
Country Hen Eggs	50	310	—	—	Sold at: Web site listed above Source of n-3: feed contains long-chain polyunsaturated fatty acids (specific content unknown) http://www.eggland.com/egglandsbest/egnb.html
Egg* Land's Best	50	—	2	100	Sold at: Food City, Food Lion, HG Hill Co., Ingles Markets, Kroger, Piggly Wiggly, Sack N Save/Mega Mart, Schnuck's Markets, Seessel's Inc., Wal-Mart Supercenter, Winn Dixie Source of n-3: "patented, all-natural vegetarian diet" containing canola oil

N-3 PUFAs IN NONTRADITIONAL FOODS

Food	Serving (g)	ALA (mg)	EPA (mg)	DHA (mg)	Source of information
Meats					
Birds Eye Ocean Hake Fillets	100	490	40	100	Sold at: stores in New York, Pennsylvania, New Jersey, and Virginia Source of n-3: flaxseed and microencapsulated powder are incorporated into hen's feed http://www.simplot.com.au/Hosting/corp/SiMSite.nsf/pages/Brands.Birds%20Eye.Birds%20Eye%20Smart%20Choice
Hans Sliced Chicken	100	-	45	135	Sold in Australia Source of n-3: enriched with unknown source of EPA/DHA. ALA source: par-fried in canola oil http://www.hans.com.au/omega3/default.asp?p=32 Sold in Australia: Coles, Bi Lo, Action stores in Queensland only. Nationally: Woolworths
Hans Strassburg	100	-	23	65	Source of n-3: microencapsulated tuna oil http://www.hans.com.au/omega3/default.asp?p=33 Sold in Australia: Coles, Bi Lo, and Action stores in Queensland only. Nationally: Woolworths
Juice					
Supajus	250 ml	-	-	100	Source of n-3: microencapsulated tuna oil Sold at: vending machines in U.K. schools Source of n-3: pure tuna oil
Nutrition bars					
Zoneperfect Lemon Yogurt	50	-	3		http://www.zoneperfect.com Sold at: CVS Pharmacy, GNC, Ingles, Sam's Club, SuperTarget, Target, Vitamin Depot Plus, Vitamin World, Wal-Mart Supercenter, Walgreens Source of n-3: molecular distilled fish oil

(Continued)

TABLE (Continued)

Food	Serving (g)	ALA (mg)	EPA (mg)	DHA (mg)	Source of information
Zoe's Flax and Soy Bars—Apple Crisp and Lemon Bars	52	2200	—	—	http://www.zoefoods.com/zoe_info/products/barsapple.htm Sold at: Earthfare, Knoxville Food Co-op, Nature's Pantry Source of n-3: ground flaxseed
Peanut Butter and Chocolate Bars	52	1500	—	—	http://www.ecobella.com/health_by_chocolate.html Sold at: www.Ecobella.com
Health By Chocolate	25	35	—	—	Source of n-3: cranberry seed oil http://www.ohmamabar.com/page/nutrition.html
Oh Mama! Nutritional Bar	50	—	—	115	Sold at: Motherhood Maternity, Buy Buy Baby, or at www.ohmamabar.com
IQ3 Brainstorm Bar	N/A	N/A	N/A	N/A	Source of n-3: DHA algal oil (Martek) http://www.iq3-brainstorm.co.uk/brainstorm.php Sold at: at most quality health food shops in the United Kingdom
Salad dressing Au Bon Pain Salad Dressing	71	—	—	N/A	Source of n-3: vegetable margarine, microencapsulated tuna oil (3.1%) http://www.aubonpain.com/nutrition.php?ID=322&HEADER=dressings&GROUP_ID=17&DOUBLELIST= Sold at: N/A
Omega-3 Mayonnaise	14	2000	—	—	Source of n-3: refined menhaden oil Sold at: local health food stores Source of n-3: flaxseed oil

N-3 PUFAs IN NONTRADITIONAL FOODS

Food	Serving (g)	ALA (mg)	EPA (mg)	DHA (mg)	Source of information
Omega-3 Balsamic Vinaigrette, Organic or Raspberry Vinaigrette	31	2000	—	—	http://www.spectrumorganics.com/index.php?id=7 Sold at: local health food stores Source of n-3: flaxseed oil
Spectrums Spread, Essentials Omega-3	14	1000	—	—	Sold at: local health food stores Source of n-3: flaxseed oil
Primevere Margarine	100	300	—	—	Sold in France Source of n-3: colza oil
Meadow Lea Hi Omega Spread	10	440	60	—	http://www.goodmanfielder.com.au/dir065/gfsite/gflimited.nsf/Content/About+us+-+Media+Release+97 Sold in Australia Source of n-3: source not revealed
Smart Balance Omega Plus Buttery Spread	100	—	150	—	http://www.smartbalance.com/product.html Sold at: Reischecks, Buehlers, Roundy's Supermarkets, Wal-Mart Supercenter
Cindy's Kitchen Salad Dressing	N/A	—	700	—	Source of n-3: menhaden oil Sold at: Food Lion, Albertson's, Wal-Mart Supercenter, Whole Foods Source of n-3: menhaden oil
Infant formula Similac by Ross	5 fl. oz.	—	—	8	Sold at: local grocery stores, Wal-Mart Supercenter, drug stores Source of n-3: <i>Cryptocodinium cohnii</i> oil

(Continued)

TABLE (Continued)

Food	Serving (g)	ALA (mg)	EPA (mg)	DHA (mg)	Source of Information
Enfamil Lipil w/ iron by Mead Johnson	-	-	17		Sold at: local grocery stores, Wal-Mart Supercenter, drug stores
Nestle Gold Start w/ DHA and ARA			N/A		Source of n-3: <i>Cryptocodinium cohnii</i> oil Sold at: local grocery stores, Wal-Mart Supercenter, drug stores
Mother's Horlicks	75	-	-	60	Source of n-3: <i>Cryptocodinium cohnii</i> oil Sold in India
Junior's Horlicks	100	-	-	40	Source of n-3: powder—microalgae Sold in India
Impact Novartis Nutritional Support	1 liter	-	1700		Source of n-3: powder—microalgae Sold at: provided at medical facilities
Beech-Nut First Advantage baby foods	4 oz.	-	-	~60	Source of n-3: menhaden oil (omega protein) http://www.beechnut.com Sold in Food Lion
Other					Source of n-3: "omega-3 enhanced egg yolks"
Omega-3 Enriched Pizza	N/A			32	http://www.nardonebros.com/ Sold at: www.nardonebros.com Source of n-3: microencapsulated tuna fish oil (Nu-Mega ingredients)

Capitolo 2

Gli acidi grassi polinsaturi di origine microbica

Le principali fonti naturali di PUFA ω -3, soprattutto DHA e EPA, sono attualmente, come già detto, i pesci grassi, come il salmone, le sardine, le aringhe e gli sgombri (vedi *tabella 1*). Gli omega-3 commercialmente disponibili sono ricavati essenzialmente dall'olio di pesce. Questo è di qualità variabile, dipende dalla specie ittica, dalla stagione e dal sito di pescaggio. Inoltre costituiscono uno svantaggio i rischi di contaminazione che derivano dall'inquinamento ambientale, e rendono necessari costosi processi di purificazione del prodotto finito. Non è possibile pertanto reperire sul mercato prodotti sicuri a base di olio di pesce a basso costo, quelli di ottima qualità, sono infatti proibitivi per la maggior parte della gente poiché sottoposti a processi di purificazione complessi, quale la distillazione molecolare. Infine, gli oli di pesce, la cui produzione annuale è insufficiente a sostenere da sola la domanda mondiale crescente di omega-3, hanno odore e sapore poco gradevoli.

La consapevolezza dell'importanza di un adeguato apporto di acidi grassi ω -3 e ω -6 nella dieta e le difficoltà tecniche nel reperire soprattutto le forme polinsature, hanno dato impulso ad una serie di ricerche miranti ad ottenere tali sostanze da vie alternative, prima fra tutte quella che vede l'uso di microrganismi oleaginosi.

La produzione di oli microbici è, oggi, già realtà economica. Di questi si hanno già applicazioni commerciali in qualità di prodotti nutraceutici e/o farmaceutici destinati all'uomo oltre che come integratori dell'alimentazione anche animale, in particolare sono usati nelle pratiche di acquicoltura. Recentemente, molto interesse ha suscitato la possibilità di produrre biodisel da oli (trigliceridi) e alcoli mediante transesterificazione di quelli, ciò, per la natura innovativa, rinnovabile ed ecosostenibile del processo (Miao and Wu, 2006;

Xue et al., 2006); tuttavia, si tratta di un argomento ancora poco esplorato.

La prima produzione commerciale di SCO (single cell oil) ossia di olio microbico, è stata nel 1985, quando, usando *Mucor circinelloides* si produsse un olio ricco in acidi grassi polinsaturi, in particolare di GLA (C18:3, n-6), che si indicò come alternativa al più costoso olio ottenuto da una specie di primula (C. Ratledge, 2005).

L'olio di pesce è soprattutto ricco di DHA, tuttavia, è poco indicato per integrare la dieta dei neonati, data la presenza di contaminanti ambientali come diossina, PCBs e metalli pesanti incluso il mercurio che, dalle acque dei mari possono accumularsi nelle carni dei pesci concentrandosi in particolare nel fegato, oltre che in altri organi.

La necessità di integrare la dieta con DHA preformato, è diventata una reale constatazione tra il 1980 e il 1990. Negli stessi anni una società commerciale negli Stati Uniti (Martek Inc, negli Stati Uniti), stava scoprendo che il DHA era un componente lipidico essenziale di alcune alghe, che, se coltivate in fermentatori su scala industriale potevano diventare reali produttrici competitive di DHA (Kyle D.J. et al., 1992).

Contemporaneamente, un lavoro giapponese alla fine del 1980, aveva dimostrato che l'ARA poteva essere ottenuto da fonti microbiche poiché, tale PUFA, era il componente essenziale dell'olio ricavato da *Mortierella alpina* (Totani N et al., 1992).

Attualmente, per la produzione di ARA-SCO sono utilizzati ceppi diversi di *M. alpina* in processi messi a punto in Europa, in Cina e in Giappone. Le specifiche di questi processi, sono in breve indicati nella tabella 3. Inoltre, vi sono almeno tre diversi processi di fermentazione attivi per la produzione di DHA-SCO, ciascuno ottimizzato su un microrganismo specifico.

Le formule destinate all'infanzia, vantano tutte nella loro preparazione un rapporto ARASCO/DHASCO pari a 2:1. Tale prodotto è commercializzato con il nome di Formulaid, incorporato nei preparati destinati all'infanzia in oltre 60 paesi in tutto il mondo. Approssimativamente 1000 tonnellate di questa miscela microbica è prodotta per anno e l'aspettativa è che sarà ben superiore alle 1000 tonnellate negli anni a venire (Kyle DJ, 2005).

Dall'analisi delle caratteristiche dei processi oggi già utilizzati per produrre oli microbici, emerge chiaramente che prerogativa necessaria perché un microrganismo possa essere impiegato come SCO è che presenti una frazione elevata di acido grasso desiderato sul totale degli acidi grassi prodotti. Caso ottimale, sarebbe se quello desiderato fosse il solo acido grasso accumulato nella cellula microbica in esame, naturalmente si tratta di una condizione poco realistica. Tuttavia, *Cryptocodinium cohnii*, utilizzato nel processo Martek, produce un olio di triacilgliceroli in cui il DHA può rappresentare fino al 50% gli acidi grassi totali, e, talvolta, si accumula anche come unico PUFA; infatti l'unico altro acido grasso insaturo che potrebbe essere rinvenuto è una relativamente piccola percentuale di acido oleico (C18:1,n-9).

Gli oli microbici hanno, quindi, caratteristiche uniche e sono completamente differenti dagli oli ottenuti da piante o animali in cui vi sono sempre percentuali di acidi grassi saturi mescolati con acidi grassi insaturi che debbono essere separati dai primi con processi alquanto costosi di purificazione. Pertanto, ogniquale volta vi sia necessità dietetica per un singolo PUFA, può essere concretamente realizzata soltanto ricorrendo agli oli microbici.

Nello spazio di 20 anni, si è dunque passati da un concetto quasi solo accademico e astratto di SCO alla messa a punto vera e propria di processi industriali che utilizzano i microrganismi come fornitori principali di PUFA omega-3 destinati all'alimentazione infantile.

Ricerche recenti confermano sempre più il ruolo terapeutico/preventivo che i PUFA omega-3 avrebbero su alcune patologie gravi dell'uomo adulto, in particolare sulle malattie cardiovascolari. Queste scoperte alimentano contemporaneamente l'interesse nei confronti delle cellule microbiche e dei loro potenziali applicativi.

I microrganismi capaci di produrre PUFA oltre i C20 sono principalmente microfunghi, batteri e microalghe marine. Tuttavia, i batteri sono i meno impiegati vista la scarsa capacità di accumulare grandi quantità di triacilgliceroli, mentre possono raccogliere nelle loro cellule acidi grassi inusuali e lipidi in genere non trovati in altri sistemi. Per selezionare i ceppi più adatti alla produzione di PUFA, esistono una serie di parametri da considerare, questi includono la velocità specifica di crescita, la quantità di biomassa prodotta, il contenuto lipidico totale e la produzione qualitativa di specifici acidi grassi in rapporto alla produzione lipidica totale. È anche importante sia nota la localizzazione cellulare degli acidi grassi prodotti, e se è parte di fosfolipidi, triacilgliceroli, ecc.

I processi che impiegano SCOs, sono stati riuniti in una monografia sull'argomento (Cohen Z *et al.*, 2005). Chiunque desideri approfondire le informazioni su questo tema può quindi indirizzarsi alla monografia citata che rimane ad oggi la più recente e completa.

Le ragioni per cui ha senso in futuro incrementare la sintesi e l'uso di PUFA microbici sono diverse; fra queste schematicamente citiamo:

- la capacità di riuscire a manipolare geneticamente i microrganismi e a controllarne le condizioni di crescita, rende possibile indirizzare la produzione endogena di acidi grassi verso i prodotti desiderati, ottenendo oli ad alto

contenuto di PUFA e quindi prodotti di elevato valore aggiunto;

	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3 (n-6)	20:3 (n-6)	20:4 (n-6)	22:0	24:0	
<i>(A) ARA-SCO processes using M. alpina strains</i>											
DSM process ^a	0.4	8	11	14	7	4	4	49	-	1	
Wuhan Alking process ^b	0.2	6	2	4	4	2	-	70	3	5	
	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 (n-3)	20:3 (n-6)	22:5 (n-6)	22:6 (n-3)
<i>(B) DHA-SCO processes</i>											
Martek process ^c (DHASCO™)	4	20	18	2	0.4	15	0.6	-	-	-	39
Omega-Tech process ^d (DHASCO-S)	-	13	29	12	1	1	2	3	1	12	25
Nutri-nova process ^a (DHActive)	-	3	30	-	1	-	-	-	-	11	46

a Il processo DSM è utilizzato usando fermentatori con 100 m3 di capacità. L'olio contenuto nella cellula è considerato essere oltre il 40% (w/v) ed è mescolato (rapporto 2:1) con DHASCO, destinato il prodotto noto con il nome di Formulaid all'infanzia. E' un processo di proprietà esclusiva della Market Biosciences Corp. La produzione annuale è di 480 tonn. (Kyle *et al.*, 2005).

b Il processo è impiegato dalla Wuhan Alking Engineering Co Ltd, Wuhan, China. Impiega fermentatori di capacità fra 50-100 m3. Le informazioni sul processo sono limitate. <http://www.alking.com.cn/english/aboutus.htm>.

c C. *crázzii* accumula oltre 40% di olio nella sua biomassa. Il processo è operato dalla Martek Biosciences Corp con fermentatori dalla capacità di 100m3. L'olio microbico, ricco in ARA, è destinato esclusivamente all'infanzia. Produzione corrente oltre 240 tonn annue. (Kyle *et al.*, 2005)

d Il processo usa *Schizosaccharomyces* sp. L'olio noto come DHAGold è prodotto dalla OmegaTech Inc., Boulder, CO. ora di proprietà della Martek. L'olio contenuto nella cellula supera il 40% (w/w) della biomassa. E' destinato ad integrare l'alimentazione umana e animale. Appross 10 tonn di olio per anno.

e Il processo impiega *Alkermes* sp. che cresce in fermentatori di 80 m3 di capacità. L'olio è prodotto dalla Nutrinova GmbH, Frankfurt, Germany ed è venduto con il nome di DHActive (Kiy T, 2005).

Tab.5. Alcuni processi impiegati per la produzione industriale di oli microbici.

Fonti di acidi grassi polinsaturi

PUFA	Fonte convenzionale	Fonte microbica
GLA	Piante (Evening primrose-primula- Borragine, Ribes nero)	Funghi (<i>Mucor circinelloides</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Mortierella isabellina</i> , <i>Mortierella ramanniana</i> , <i>Cunninghamella echinulata</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Cunninghamella japonica</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Thamnidium elegans</i>), alghe (<i>Spirulina platensis</i> , <i>Chorela vulgaris</i>)
DGLA	Latte materno, tessuti animali pesce (<i>Scomber scombrus</i>), muschi (<i>Pogonatum urnigerum</i>)	Funghi (<i>Mortierella</i> spp., specialmente <i>Mortierella alpina</i> , <i>Conidiobolus nanodes</i> , <i>Saprolegnia ferax</i>)
AA	Tessuti animali, pesce (<i>Brevoortia</i> , <i>Clupea</i>), muschi (<i>Ctenidium molluscum</i>)	Funghi (<i>Mortierella</i> spp., specialmente <i>Mortierella alpina</i> , <i>Conidiobolus nanodes</i> , <i>Entomophthora exitalis</i> , <i>Blastocladiella emersonit</i>), alghe (<i>Porphyridium cruentum</i> , <i>Sargassum salicifolium</i> , <i>Euglena gracilis</i>)
MA	Tessuti animali	Funghi (<i>Mortierella alpina</i>)
EPA	Pesce (arringhe, menhaden), molluschi (granchio blu, ostrica, aragosta, mitili)	Funghi (<i>Mortierella alpina</i> , <i>Mortierella elongata</i> , <i>Pythium irregulare</i> , <i>Pythium ultimum</i>), alghe (<i>Chlorella minutissima</i> , <i>Chlorella minutissima</i> , <i>Monodus subterraneus</i> , <i>Polysiphonia latifolium</i> , <i>Porhyridium cruentum</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Nannochloropsis oculata</i> , <i>Amphidinium carteri</i> , <i>Thalassiosira pseudonana</i>), batteri (<i>Shewanella putrefaciens</i>)
ETA	Tessuti animali	Funghi (<i>Mortierella alpina</i>)
DPA	Pesce	Funghi (<i>Schyzochitrium</i> sp.)
DHA	Pesce (tonno, arringa, merluzzo, sardina, salmone, menhaden) molluschi (granchio blu, mitili, aragosta, ostrica)	Funghi (<i>Thraustochytrium aureum</i> , <i>Thraustochytrium roseum</i> , <i>Schyzochitrium</i> SR-21, <i>Schyzochitrium aggregatum</i>), alghe (microalga MK8805, <i>Cryptohcodinium cohnii</i> , <i>Gyrodinium nelsoni</i> , <i>Amphidinium carteri</i> , <i>Gonyaulax polyedra</i>), batteri (<i>Vibrio</i> spp., <i>Rhodopseudomonas</i> spp.)

Tab.6.
Fonti microbiche
di acidi grassi
polinsaturi
(Certik M et
al., 1999).

- la produzione in laboratorio elimina le problematiche relative alla purificazione dell'olio di pesce;
- la stabilità ossidativa dei lipidi microbici in generale è alta se comparata all'olio di pesce;
- i PUFA possono essere prodotti utilizzando materie prime selezionate poco costose, con rese sul prodotto molto elevate riducendo così i costi di produzione;
- SCO's possono essere coltivate in qualunque momento dell'anno, poiché i processi fermentativi non sono condizionati dal clima o dalle stagioni;
- la conoscenza dei pathways biochimici e della genetica dei microrganismi può fornire sempre nuovi strumenti utili a definire sistemi di produzione di PUFA che siano sempre più innovativi ed interessanti.

La biochimica dell'oleagenicità dei microrganismi

Gli organismi viventi accumulano, tutti, lipidi nelle loro membrane e in compartimenti specializzati, ma solo pochi ne accumulano oltre il 20% del peso della biomassa.

I microrganismi, in particolare, sono poi in grado di raccogliere quantità elevate di tali composti in forma di triacilgliceroli che possono rappresentare fino al 70% della biomassa nelle specie più oleaginose (Ratledge C. *et al.* 2004).

Le piante, in genere, non sintetizzano PUFA più lunghi di 18 atomi di carbonio.

I batteri non producono triacilgliceroli ma poliβ-idrossibutirradi e -alcanoati, mentre i lieviti, i funghi e alcune alghe sono geneticamente predisposti ad accumulare quantità elevate di lipidi; questa caratteristica permette di classificarli come specie oleaginose.

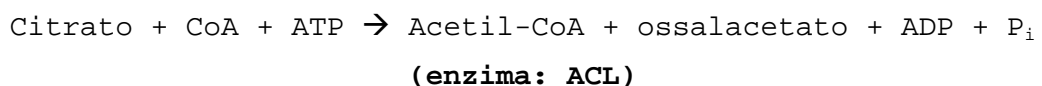
I microrganismi eucarioti, oleuginosi e non oleuginosi, condividono lo stesso pathway biosintetico degli acidi grassi, tuttavia, esiste fra loro una differenza fondamentale che li contraddistingue in presenza di un eccesso di fonte di carbonio. Ponendo i microrganismi in un terreno in cui vi

siano abbondante fonte di carbonio e quantità limitante di azoto, quando tutta la fonte di azoto è stata consumata l'accumulo di carbonio non si interrompe: i microrganismi oleaginosi utilizzano la fonte di C per la sintesi lipidica risultando in un eccesso di triacilgliceroli; i microrganismi non oleaginosi invece convertono il C in polisaccaridi (glicogeno, glucani, mannani, ecc.) e non sono predisposti ad accumulare grassi (al massimo possono fino al 10-20%). Come già detto, poiché il pathway biosintetico degli acidi grassi è lo stesso, il motivo di questa differenza e quindi dell'oleagenicità, si trova altrove ed è probabile sia in relazione con:

- a- la produzione di Acetil-CoA nel citosol come precursore per la FAS (Fatty Acids Synthetase) e con
- b- la produzione di NADPH, usato come riducente nella sintesi degli acidi grassi

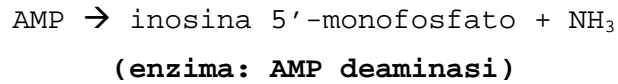
a - Produzione di Acetil-CoA come precursore per la FAS

I microrganismi oleaginosi producono Acetil-CoA perché possiedono il complesso della ACL (ATP: citrato liasi), enzima che i microrganismi non oleaginosi non sembrano avere. La reazione catalizzata è la seguente:



Il citrato (acido citrico) è disponibile nel citosol poiché deriva dal ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA cycle) che ha luogo nel mitocondrio che questi microrganismi in quanto eucarioti necessariamente possiedono. Tuttavia, solo i microrganismi oleaginosi riescono ad accumulare acido citrico in questa fase, perché, nel loro ciclo TCA l'attività della isocitrato-DH è dipendente da AMP (dipendenza assente nei microrganismi non oleaginosi).

Nei microrganismi oleaginosi, avviene per azione dell'enzima specifico la seguente reazione:



Dunque, la limitazione della fonte d'azoto innesca, nei microrganismi in questione, una cascata di reazioni che porta alla formazione di Acetil-CoA, infatti si verificano:

- l'aumento dell'attività della AMP deaminasi;
- la riduzione, per conseguenza, della [AMP]_{cellulare} (anche nel mitocondrio);
- la riduzione di [AMP] determina uno stop all'attività della isocitrato DH;
- conseguentemente, si accumula isocitrato che, viene equilibrato con acido citrico, la cui concentrazione aumenta nel mitocondrio;
- il citrato viene esportato nel citosol attraverso il ciclo del citrato/malato (export di citrato, import di malato);
- l'ACL nel citosol taglia il citrato in Acetil-CoA e ossalacetato.

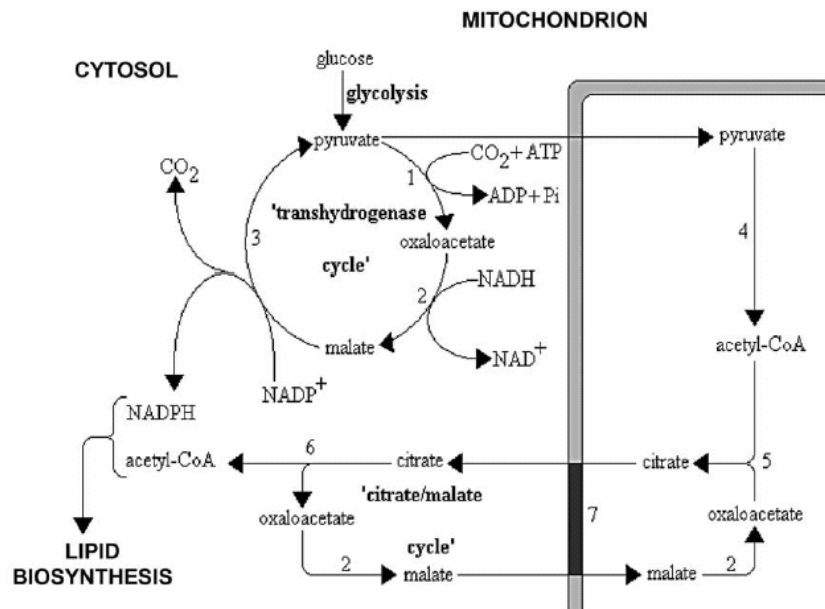


Fig.7. Il ciclo del citrato/malato e il ciclo della transidrogenasi forniscono i precursori di acetil-CoA e NADPH per la lipogenesi nei microrganismi oleaginosi (Ratledge C. et al., 2004).

L'acetil-CoA è usato per la sintesi degli acidi grassi mentre l'ossalacetato è convertito a malato dalla malato DH.

Tutti i microrganismi che accumulano grassi hanno, dunque, attività di ATP: citrato liasi, ma questa non è l'unico motivo della loro oleagenicità.

b - Produzione di NADPH come riducente nella sintesi degli acidi grassi

Alcuni microrganismi con attività ACL non sono in grado di accumulare lipidi (anche se, viceversa, non sono mai stati caratterizzati organismi in grado di accumulare lipidi che fossero privi di attività ACL). Gli acidi grassi sono altamente ridotti; di conseguenza occorre un agente riducente, il NADPH, prodotto principalmente dall'enzima malico:

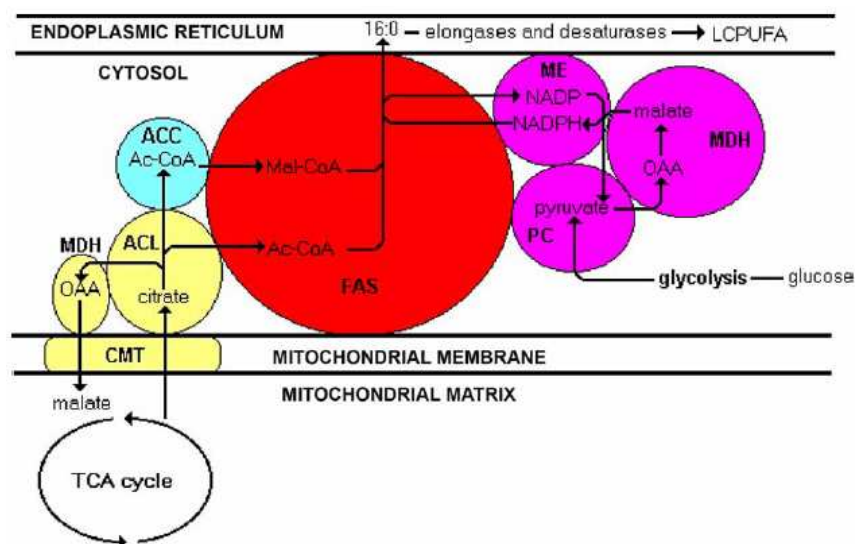
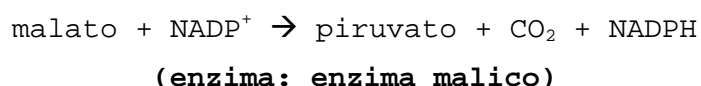


Fig. 8. L'organizzazione dell'ipotetico "metabolone" lipogenico.

OAA: ossalacetato; AC-CoA: acetil-CoA; Mal-CoA: malonil-CoA; FAS: fatty acid synthase; ACL: ATP:citrato liasi; ACC: acetil-CoA carbossilasi; CMT: citrato/malato translocasi; ME: enzima malico; PC: piruvato carbossilasi; MDH: malate deidrogenasi. Giallo: enzimi del ciclo del citrate/malato; viola: ciclo della transidrogenasi. (Ratledge C. et al., 2004).

L'attività dell'enzima malico è stata individuata nella maggior parte dei microrganismi oleaginosi. L'ipotesi è che esista un complesso enzimatico che comprende enzima malico, ACL e FAS e che consente l'indirizzamento diretto dell'Acetil-CoA verso la sintesi degli acidi grassi.

Poiché l'enzima malico non è stato individuato in tutti i microrganismi oleaginosi, e può essere assente in alcuni lieviti oleaginosi, è stato supposto esista un enzima alternativo in grado di generare NADPH. Il modello proposto non è quello di un pool di NADPH che può essere prodotto da un certo numero di enzimi ad attività NADPH-generatrice; piuttosto, si tratterebbe di un'integrazione di sistemi adibiti alla produzione di NADPH con "la macchina" enzimatica predisposta alla sintesi degli acidi grassi.

La biosintesi degli acidi grassi polinsaturi (PUFA)

La biosintesi degli acidi grassi in quasi tutti gli organismi culmina con la formazione di acidi grassi C16 o C18 saturi. Questi, vengono modificati da una sequenza di desaturasi ed elongasi, enzimi, capaci di inserire un range definito di insaturazioni nella molecola cui progressivamente sono anche aggiunti atomi di carbonio.

Il profilo qualitativo di questa produzione dipende dalla specie. Nei lieviti oleaginosi, gli acidi grassi trovati più di frequente sono rappresentati dall'acido oleico (C18:1,n-9), dall'acido linoleico (C18:2,n-6), dall'acido palmitico (C16:0) e dal palmitoleico (C16:1), oltre che dai C18:3 o alpha-linolenico che, in genere, rappresentano meno del 10% del totale.

Funghi e microalghe sono gli organismi in cui i PUFA possono rappresentare gli acidi grassi totali con una frazione oltre il 20%. L'interesse commerciale si è concentrato molto su questi ultimi microrganismi perché geneticamente predisposti ad accumulare elevate quantità di quegli acidi grassi polinsaturi di interesse.

Gli acidi grassi insaturi sono sintetizzati da un **meccanismo aerobio** o altrimenti da uno **anaerobio**.

La sintesi di PUFA è associata ad enzimi legati alla membrana e il sistema di desaturazione, proprio del pathway aerobio, è composto da una serie di proteine: NAD(P)H-citocromo b₅ reductasi, acil-CoA desaturasi, acil-ACP desaturasi, acil-lipide desaturasi. Le desaturazioni sono svolte a livello del reticolo endoplasmatico, dove gli acidi grassi sono inseriti nei fosfolipidi strutturali.

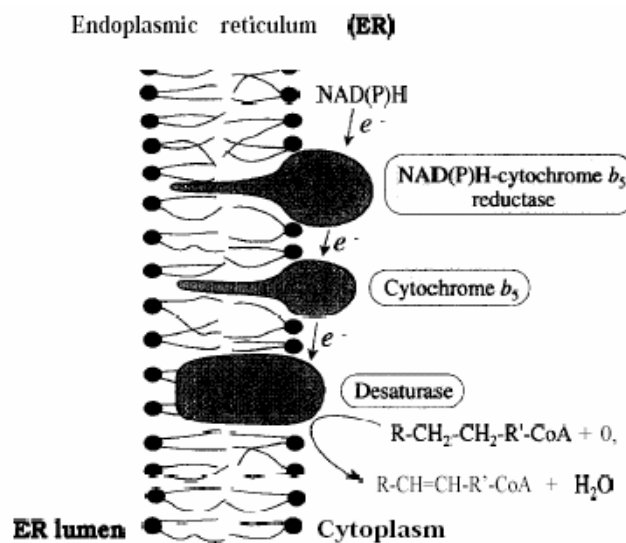


Fig.9. Complesso enzimatico di desaturazione aerobica per la formazione di acidi grassi insaturi nei microrganismi (Certik M. *et al.*, 1999).

Il primo doppio legame è introdotto nella posizione $\Delta 9$ o all'altezza del C9 dei composti saturi, a seguito della quale si forma acido oleico (C18:1,n-9). L'acido oleico (OA) viene desaturato dalla desaturasi $\Delta 12$ ad acido linoleico (LA), che può essere ulteriormente desaturato ad acido α -linolenico (α -LA) per azione della desaturasi $\Delta 15$. I tre acidi grassi OA, LA e α -LA, sono i precursori rispettivamente delle "cascate" di sintesi degli ω -9 degli ω -6 e degli ω -3.

Gli steps successivi consistono in una sequenza di passaggi alternati di desaturazione ed allungamento catalizzati da desaturasi diverse ed elongasi specifiche.

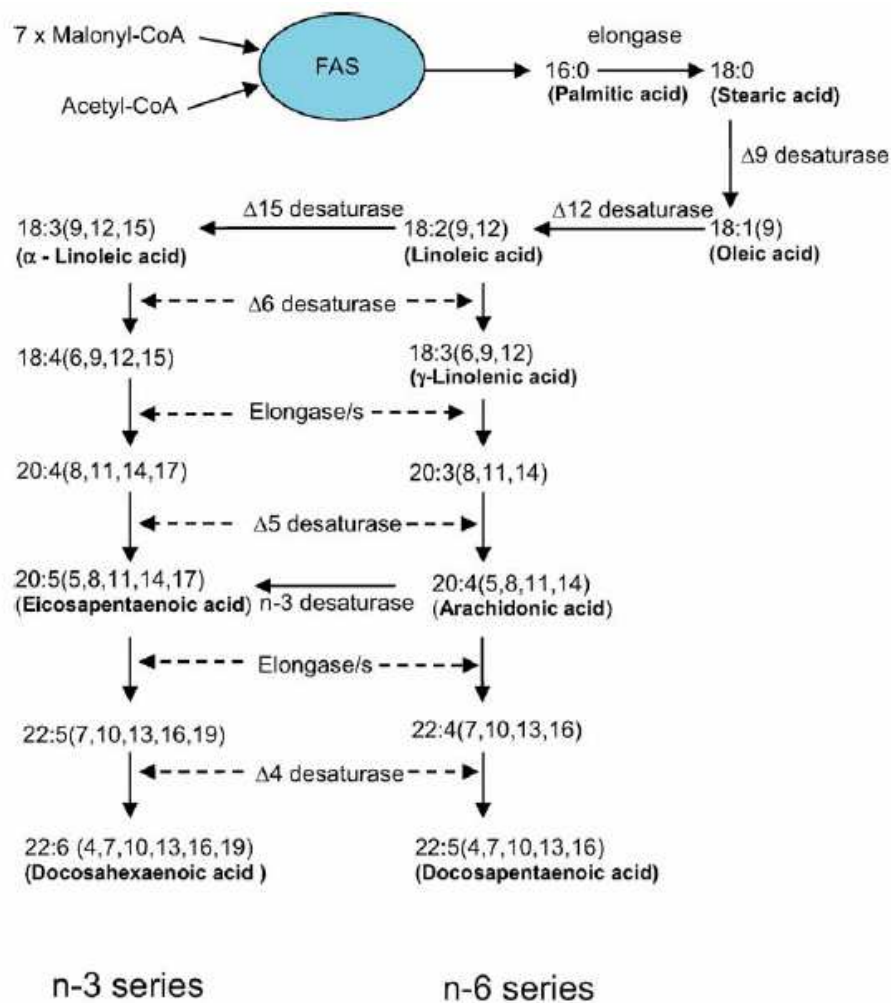


Fig.10. Pathway per la formazione di PUFA ω -3/ ω -6 nei microrganismi usando la via della FAS (Ratledge C. *et al.*, 2004).

La famiglia degli ω -9 è interamente sintetizzata a partire dall'acido oleico con la desaturazione di quest'ultimo per azione della Δ 6 desaturasi, seguita da un passaggio di allungamento, e da una nuova desaturazione (Δ 5 desaturasi).

La famiglia degli ω -6 deriva dal precursore essenziale acido linoleico grazie a tre insaturazioni (desaturasi Δ 6, Δ 5, Δ 4) e altrettanti steps di allungamento fino all'acido grasso più lungo, il DPA (acido docosapentaenoico, C22:5,n-6).

Per la sintesi della famiglia degli ω -3 esistono due vie biosintetiche: una temperatura indipendente e l'altra temperatura dipendente (quest'ultima solo di alcuni microrganismi). La prima consiste di tre desaturazioni (Δ 6,

$\Delta 5$, $\Delta 4$) alternate a fasi di allungamento, fino ai prodotti finali EPA (C20:5,n-3), DPA (C22:5,n-3) e DHA (C22:6,n-3). Il secondo pathway, che è dipendente dalla temperatura, coinvolge la conversione degli acidi grassi ω -6 nei corrispondenti ω -3; il passaggio è catalizzato da desaturasi, probabilmente $\Delta 15$ e $\Delta 17$.

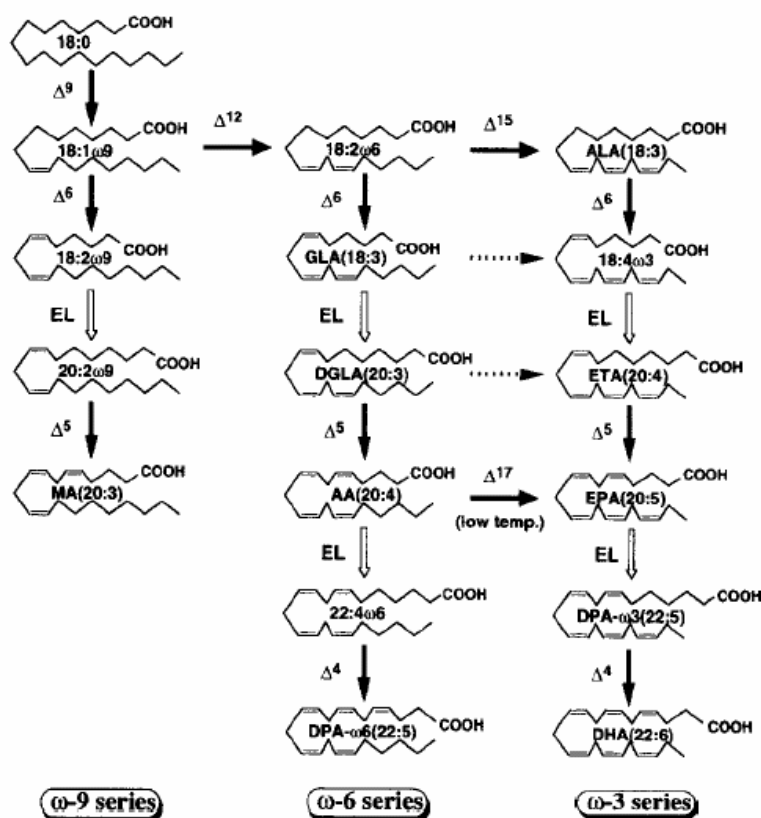


Fig.11. Pathway biosintetico dei PUFA nei microrganismi.

EL - elongasi; $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 15$, $\Delta 17$ - desaturasi. (Certik M. et al., 1999).

Entrambe le serie di PUFA n-6 e n-3 vengono incorporate nelle membrane biologiche, sotto forma di componenti di fosfolipidi e di glicolipidi. A tale livello competono per lo stesso sistema enzimatico. Le vie metaboliche della serie linoleica e α -linolenica utilizzano, infatti, gli stessi enzimi per le reazioni di allungamento e desaturazione che dall'acido linoleico e α -linolenico conducono, rispettivamente, alla formazione di acido arachidonico (PUFA n-6) e di acido eicosapentaenoico (PUFA n-3).

Un elemento caratteristico del pool di acidi grassi trovati in *Schizochytrium* sp. e *Ulkenia* sp., entrambi organismi eucarioti eterotrofi appartenenti all'ordine dei Thraustochitridi è la presenza di un secondo PUFA, oltre al DHA: il DPA- ω 6 (C22:5,n-6) (Ratledge C. et al., 2004). Si tratta di un acido grasso insolito, presente in piccole quantità esclusivamente nei lipidi animali e non influisce negativamente sull'assorbimento di DHA dalla dieta. Il motivo per cui questo acido grasso sia presente solo nel pattern lipidico dei due gruppi microbici su indicati è tuttora sconosciuto, si è solo riusciti a supporre, possa essere convertito in DHA tramite una specifica n-3 desaturasi.

Il pathway di sintesi dei PUFA nei Thraustochitridi sembra essere una via bacterial-like polyketide synthase o PKS ed è sostanzialmente differente da quella degli organismi eucarioti.

Il microrganismo marino *Schizochytrium* sp. usa un sistema PKS-like che coinvolge anch'esso acetil-CoA e malonil-CoA ma non prevede riduzione in situ degli intermedi. Si tratta di un sistema anaerobico di sintesi, contrapposto al sistema aerobico delle altre cellule eucariotiche. Contemporaneamente alla sua identificazione in *Schizochytrium*, il sistema di sintesi PKS è stato visto appartenere anche ai batteri *Shewanella* e *Moritella marina* che producono rispettivamente EPA e DHA.

Studi hanno evidenziato almeno 11 regioni interne alle ORFs di *Shewanella* e di *Schizochytrium* che potrebbero essere potenziali domini enzimatici. Di queste 11, 8 erano strettamente collegate a proteine PKS batteriche, le rimanenti 3 appaiono omologhe a proteine del complesso FAS (Metz J. Et al., 2001). Gli otto domini PKS coinvolti nella biosintesi dei PUFA sono stati trovati in *Schizochytrium* sp. in una sequenza genetica diversa da quella di *Shewanella*. Codificano per: 3-chetoacil sintasi (KS) nota come "condensing enzyme", malonil-CoA:ACP aciltransferasi (MAT), proteina acil carrier (ACP), 3-

chetoacil-ACP reduttasi (KR), aciltransferasi (AT), chain length factor (CLF), enoil reduttasi (ER) e deidrasi/isomerasi (DH).

Un sistema simile è stato individuato anche in *Ulkenia sp.*

La sintesi dell'acido docosoesanoico (DHA, C₂₂:6,n-3) da acetil-CoA richiede circa 30 distinte attività enzimatiche e quasi 70 reazioni. Nella strategia di sintesi del DHA dei traustochitridi, la biosintesi degli acidi grassi a lunga catena sembra avvenire con un meccanismo alternativo nel quale le catene idrossiliche in allungamento non sono ridotte progressivamente ad acidi grassi insaturi, come nelle vie eucariotiche. Il complesso PKSs svolge alcune stesse reazioni della FAS eucariotica ed utilizza gli stessi domini proteici, acil vettori di proteine (ACP), e simili siti per legare covalentemente le catene idrossiliche in allungamento, tuttavia, il ciclo completo di riduzione, disidratazione, e ulteriore riduzione, proprio della FAS, è spesso abbreviato, così da produrre intermendi idrocarbonici altamente derivatizzati che solitamente contengono molti cheto e idrossi gruppi, così come doppi legami C-C in configurazione trans. I prodotti diretti della PKS sono spesso ciclici e destinati a formare complessi biochimici, includendo antibiotici, aflatossine, e molti altri prodotti secondari (Keating T. A. *ret al.*, 1999).

Il meccanismo (*figura 12*) probabilmente inizia con la trasformazione di acetil-CoA e malonil-CoA nei rispettivi esteri acetil-ACP e malonil-ACP. L'enzima KS li condensa e ciò origina butil-ACP, dopo l'azione delle KR, delle DH e delle ER. Addizioni successive di malonil-CoA mantengono il doppio legame introdotto dalla DH.

Una isomerasi convertirebbe successivamente il doppio legame dalla originale conformazione *trans* a quella *cis* e simultaneamente lo sposterebbe nella posizione 3,4. Ulteriori aggiunte di malonil-CoA condurrebbero, poi, ad un allungamento della catena in cui i doppi legami sono mantenuti se si trovano in posizione corretta.

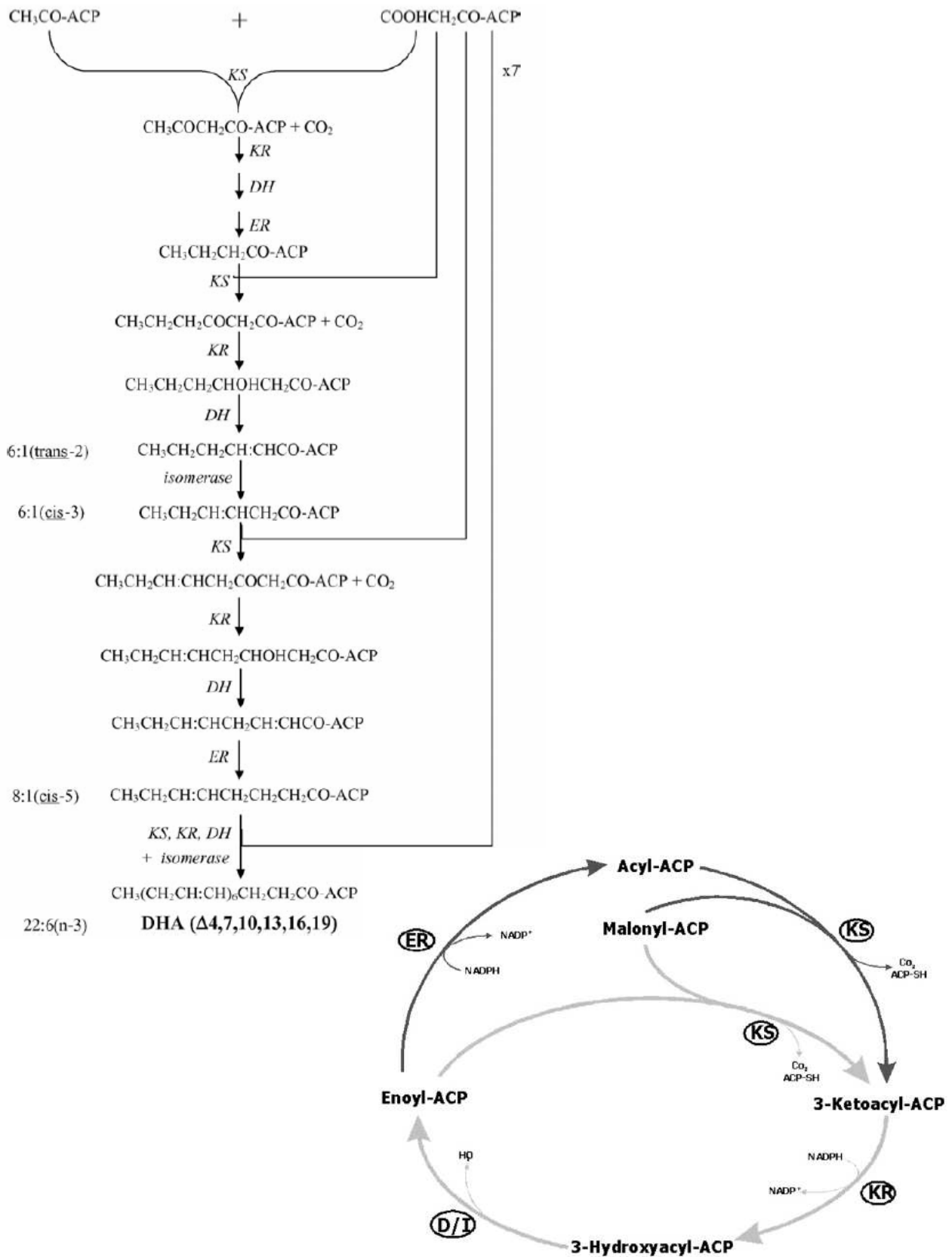


Fig.12. La via di sintesi PKS di *Schizochytrium* sp. e probabilmente di altri traustochitridi, come *Ulkenia* sp. (Qiu X. Et al., 2001; Qiu X, 2003)

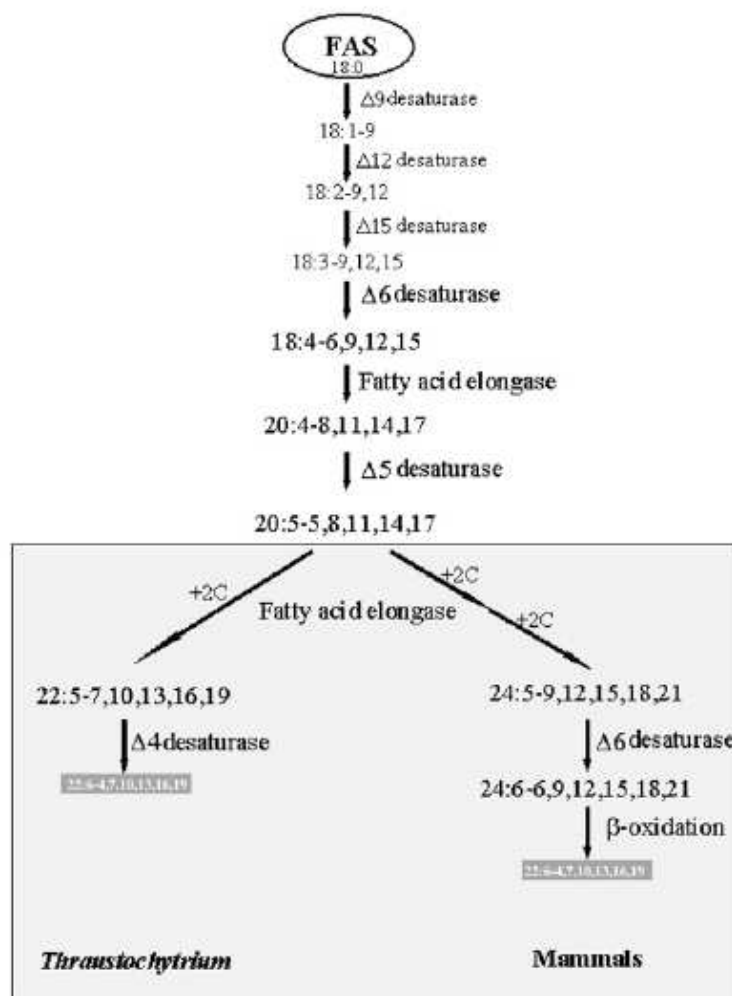


Fig.13. Il pathway aerobico ipotetico (desaturazioni ed allungamenti) per la biosintesi di DHA (Qiu X, 2003).

Al di là di questo meccanismo, studi diversi, propongono invece, per la sintesi di DHA, un sistema di elongasi e desaturasi più simile a quello eucariotico. Tale ipotesi si basa sulla scoperta di una desaturasi $\Delta 4$ in una specie di *Thraustochytrium* che è strettamente collegata sia a *Schizochytrium* che ad *Ulkenia* (Qiu X. *Et al.*, 2001; Qiu X, 2003), e rimarcando la stretta similarità tassonomica tra *Thraustochytrium* e *Schizochytrium* e il fatto che il profilo di acidi grassi dei microrganismi in esame è alquanto simile, avendo entrambi DPA (n-6) piuttosto che DPA (n-3), ha dedotto che il pathway biosintetico di tali microrganismi fosse lo stesso.

Tale conclusione, potrebbero spiegare perché molti microrganismi produttori di DHA non sintetizzino acidi grassi di lunghezza intermedia. Infatti, il sistema PKS sembra funzionare a "grondaia". Qui, le unità fondamentali (malonil-CoA e acetil-CoA) entrano da un estremo mentre il prodotto finito emerge dal lato opposto. Gli intermedi, probabilmente, se ci sono, non vengono rilasciati dal processo.

Dal punto di vista evolutivo, si tratta di una strategia pensata come un risparmio energetico, perché vi è una richiesta ridotta di NADPH come potere riducente.

Modulazione del metabolismo degli EFA

Gli acidi essenziali, LA e ALA, dopo essere stati ingeriti, sono metabolizzati dalle stesse desaturasi $\Delta 6$ e $\Delta 5$ e dalle medesime elongasi nei rispettivi metaboliti a lunga catena e alto grado di insaturazione, competendo l'uno con l'altro per lo stesso pathway enzimatico. Tuttavia, la $\Delta 6$ e la $\Delta 5$ desaturasi manifestano una preferenza metabolica per gli ω -3 piuttosto che per gli ω -6. D'altra parte l'acido oleico (C18:1,n9), che non è un acido grasso essenziale, è anche metabolizzato dagli stessi enzimi in questione, $\Delta 6$ e $\Delta 5$ desaturasi. In vista della preferenza di questi enzimi per gli acidi grassi essenziali LA e ALA, in normali condizioni fisiologiche i metaboliti della serie degli omega-9 sono formati solo in quantità insignificanti, non a caso, la presenza di quantità sensibili di omega-9 nelle cellule e nel plasma è sintomatico di un deficit di AGE.

Diversi sono i fattori in grado di influenzare le attività delle desaturasi e delle elongasi. Per esempio grassi saturi, colesterolo, acidi grassi trans, alcoli, adrenalina, e glucocorticoidi possono svolgere attività inibitoria nei confronti delle desaturasi $\Delta 6$ e $\Delta 5$; piridossina, zinco, e magnesio sono, invece, co-fattori necessari per la normale attività della $\Delta 6$ desaturasi; l'insulina attiva la $\Delta 6$ desaturasi che infatti nei diabetici ha un'attività

compromessa; virus oncogenici e radiazioni inibiscono la $\Delta 6$ desaturasi la cui attività è pure governata dall'avanzare dell'età. Totale digiuno, deficit di proteine, diete ricche di glucosio possono ridurre l'attività della $\Delta 6$ desaturasi, per contro, diete povere di grassi e a ridotto contenuto calorico la attivano. L'attività della $\Delta 6$ e della $\Delta 5$ desaturasi sono fortemente compromesse da patologie come diabete mellito, ipertensione, iperlipidemia, e sindrome metabolica X. Infine, acidi grassi in forma trans, saturi e colesterolo possono interferire con il metabolismo degli EFA promuovendo stati di infiammazione e aterosclerosi coronaria (Lopez-Garcia E et al., 2005; Mozaffarian D et al., 2004), effetti che li designano quali agenti pro-infiammatori cui gli EFA e, in generale, tutti i PUFA vi si contrappongono con proprietà anti-infiammatorie.

Il caso dei lieviti oleaginosi: l'accumulo dei lipidi

Tra le circa 600 specie di lieviti conosciuti, meno di 30 accumulano lipidi in una frazione "grassa" misurata oltre il 20% della biomassa.

E' noto che i lieviti utilizzati comunemente nella produzione industriale di birra e di prodotti alimentari, come *Saccharomyces cerevisiae* o *Candida utilis*, producono lipidi sempre in quantità minime (5-10% della loro biomassa) anche se cresciuti nelle stesse condizioni di altre specie di lieviti, note oleaginose, come *Rhodotorula*, *Lypomyces* o *Cryptococcus*, che invece arrivano ad accumularne fino al 40-70% in peso, secondo la specie.

Nella tabella 7 si riportano i principali generi di lieviti cui appartengono le specie ritenute oleaginose (Ratledge C. e Tan K.H., 1990).

Come detto in un precedente paragrafo, nei lieviti considerati oleaginosi, la gamma di acidi grassi rappresentata è piuttosto limitata. Dominano l'acido oleico (C18:1,n-9), l'acido

linoleico (C18:2,n-6), l'acido palmitico (C16:0) e l'acido palmitoleico (C16:1,n-7).

Genere	Massimo contenuto di lipidi
<i>Candida</i>	da 37 a 58%
<i>Cryptococcus</i>	da 32 a 65%
<i>Endomycopsis</i>	65%
<i>Hansenula</i>	da 22 a 65%
<i>Lipomyces</i>	da 63 a 67%
<i>Rhodospodium</i>	51%
<i>Rhodotorula</i>	da 28 a 72%
<i>Trichosporon</i>	da 33 a 45%
<i>Trigonopsis</i>	40%
<i>Yarrowia</i>	36%

Tab.7. Generi di lieviti oleaginosi e loro massimo contenuto di lipidi.

Genere	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	18:4	20:0	22:0	23:0	24:0
<i>Candida</i>	19-44	0-5	5-10	31-57	7-17	0-5	0-1	0	0	0	0
<i>Cryptococcus</i>	16	1	3	56	0	3	0	7	12	0	0
<i>Endomycopsis</i>	15	0	2	57	24	1	0	0	0	0	0
<i>Hansenula</i>	16	16	0	45	16	5	0	0	0	0	0
<i>Lipomyces</i>	31-37	4-6	5-15	43-51	3-6	0-1	0	0	0	0	0
<i>Rhodospodium</i>	18	18	3	66	0	0	0	0	0	3	6
<i>Rhodotorula</i>	10-14	2-9	0-4	19-26	44-49	3-16	0	0	0	0	0
<i>Trichosporon</i>	13	0	22	50	13	0	0	0	0	0	0

Tab.8. Acidi grassi maggiormente rappresentati (%w/w) nelle specie di lieviti oleaginosi.

Dalla *tabella 8* è possibile constatare come i lieviti comuni, in genere, non contengono acidi grassi inusuali che potrebbero renderli target potenzialmente interessanti dal punto di vista commerciale. Invece funghi e microalghe sono ricchi di acidi grassi di particolare interesse alimentare, quali acido γ -linolenico (C18:3,n-6), acido eicosapentaenoico (C20:5,n-3) e acido docosaesanoico (C22:6,n-3); motivo per cui l'interesse rimane concentrato di certo su questi ultimi microrganismi piuttosto che sui lieviti oleaginosi (Ratledge C., 2004).

Le principali molecole lipidiche presenti nei lieviti sono i triacilgliceroli (TAG) e gli steril-esteri (SE) e vengono accumulati nella cellula durante la fase di sviluppo stazionaria. I TAG hanno una distribuzione dei sostituenti acilici molto simile a quella trovata negli oli delle piante, in particolare la posizione centrale del glicerolo è occupata quasi esclusivamente da un gruppo acile insaturo. Poiché si tratta di molecole con carica nulla, esse non possono far parte delle membrane cellulari, vengono tuttavia sequestrate in particelle lipidiche idrofobiche denominate *lipids particles* LP (o *lipids bodies*).

I lipidi, che si accumulano entro un lievito oleaginoso sotto forma di microgoccioline, sono composti quasi interamente da triacilgliceroli; la loro estrazione porta normalmente alla coestrazione di altre frazioni lipidiche (fosfolipidi, steroli, steril-esteri ed altro) associate alla membrana cellulare. Vari studi mostrano spesso nella frazione di lipide estratto la presenza di acidi grassi liberi dovuti però ad una lipolisi incontrollata che avviene durante il processo estrattivo.

La tabella seguente mostra i risultati di analisi volte alla determinazione dei costituenti dei lipidi presenti in diverse specie di lieviti oleaginosi.

Genere	TAG	DAG	MAG	FFA	S	SE	PL	GL
<i>Cryptococcus</i>	92	2.5	1	3	1	1	2	0
<i>Lipomyces</i>	95	1	0	<1	1	0	3	0
<i>Rhodotorula</i>	67	0	0	4	2	7	11	6
<i>Trichosporon</i>	82	1	0	0	10	1	4	0

Tab. 9. Composizione lipidica (%w/w) di lieviti oleaginosi selezionati.
TAG: triacilgliceroli; DAG: diacilgliceroli; MAG: monoacilgliceroli; FFA: acidi grassi liberi; S: steroli; SE: steril-esteri; PL: fosfolipidi; GL: glicolipidi.

Quando si mostra necessario TAG e SE possono essere idrolizzati e rilasciati sotto forma di steroli,

diacilgliceroli (DAG) e acidi grassi, utilizzati nella biosintesi della membrana plasmatica oppure come riserva di energia. Gli steroli incorporati nella membrana possono modulare le proprietà fisiche del doppio strato, come per esempio la sua fluidità. Gli acidi grassi derivati dalla degradazione di TAG e SE possono anche essere reincorporati in complessi lipidici dopo la loro attivazione con CoA.

La via di accumulo dei lipidi prevede il passaggio attraverso tre fasi consecutive: la sintesi, la conservazione e la mobilizzazione, processi che richiedono l'interazione di diversi componenti cellulari, in particolare la membrana plasmatica, le particelle lipidiche LP e il reticolo endoplasmatico.

La struttura delle LP, nelle quali sono immagazzinati i lipidi neutri che non sono in grado di integrarsi nelle membrane a doppio strato, assomiglia a quella delle lipoproteine dei mammiferi. Un singolo strato di fosfolipidi costituisce la membrana esterna, sotto la quale si trova un piccolo strato proteico che circonda il nucleo idrofobico formato da TAG e SE. In *S. cerevisiae* le LP contengono circa la medesima quantità di triacilgliceroli e steril-esteri, mentre studi su lieviti oleaginosi come *Yarrowia lipolytica* hanno evidenziato una percentuale preponderante di TAG.

La biogenesi delle LP è ancora materia di dispute, ma uno dei modelli più accettati è il cosiddetto "modello a gemmazione", che ipotizza la formazione delle LP a partire dalla membrana del reticolo endoplasmatico (*figura 14*). Secondo questo modello, enzimi specifici ivi localizzati sintetizzano lipidi neutri, come TAG e SE, che si accumulano all'interno del doppio strato fosfolipidico della membrana dell'ER. Questo accumulo di grasso continua ad estroflettersi dal reticolo endoplasmatico fino a quando non si stacca una LP matura.

I lipidi neutri depositati nelle LP possono anzitutto servire per una rapida risposta ai cambiamenti ambientali che si attua attraverso l'uso degli steroli, dei DAG e degli acidi grassi liberati dalla loro degradazione. Il principale sterolo nei

lieviti, l'ergosterolo, può essere direttamente incorporato nella membrana a doppio strato, i DAG, invece, possono essere destinati alla biosintesi dei lipidi.

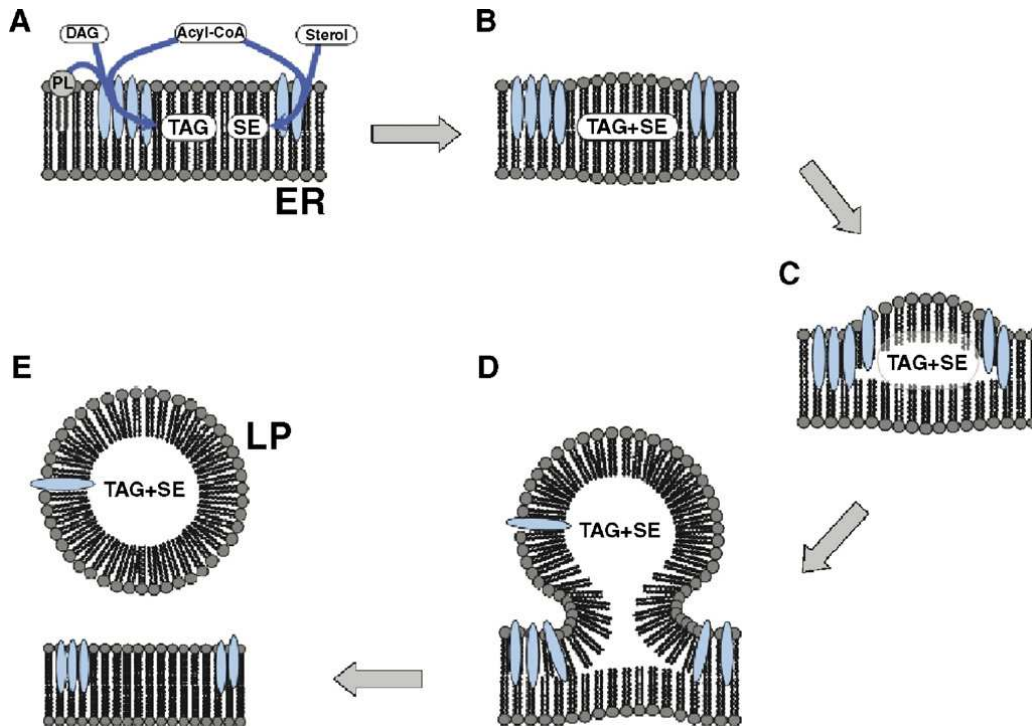


Fig.14. Formazione delle LPs dalla membrana del reticolo endoplasmatico tramite gemmazione.

In origine, le LP erano considerate semplici compartimenti di deposito, ma studi più recenti indicano come questi organelli abbiano parte in realtà in svariati processi cellulari. Per esempio, riescono a proteggere alcuni polipeptidi dalla degradazione enzimatica del citosol isolandoli nell'ambiente idrofobico interno. Nonostante l'interessante teoria del modello di gemmazione, la genesi delle LP non è ancora stata esaminata in modo esauriente, e l'insieme degli enzimi coinvolti in questo processo deve ancora essere identificato e caratterizzato (Czabany T., Athenstaedt K. e Daum G, 2007).

Composizione della membrana lipidica dei microorganismi psicrofili

L'acclimatazione e l'adattamento sono fenomeni di natura genetica governati anzitutto dalla necessità di mantenere la funzionalità della membrana nei microorganismi esposti a temperature di sviluppo molto basse. I maggiori eventi di adattamento metabolico che si riscontrano in condizioni di psicrofilia sono, infatti, quelli coinvolti nel mantenimento della fluidità della membrana.

Le basse temperature hanno effetti avversi sul doppio strato fosfolipidico che irrigidendosi perde, anzitutto, la caratteristica di essere permeabile in modo controllato. Gli psicrofili, quindi, sono costretti ad iniziare una combinazione di eventi, inerenti la composizione della membrana, con lo scopo di aumentarne la fluidità, modificarne il *packing order* nonché ridurre il numero di interazioni (D'Amico S. et al., 2006; Morgan-Kiss R.M. et al., 2006).

Le modalità di adattamento attuate includono schematicamente:

- l'incorporazione di acidi grassi poliinsaturi per impedire l'irrigidimento della membrana;
- l'aumento del contenuto di proteine e pigmenti carotenoidi non polari (D'Amico S. et al., 2006);
- l'incorporazione di acidi grassi ramificati;
- l'incorporazione di acidi grassi ciclici;
- la variazione della proporzione tra acidi grassi con catena lunga e acidi grassi con catena corta; questi ultimi hanno un punto di fusione più basso rispetto a quello degli acidi grassi a catena lunga. Infatti, catene più lunghe riescono facilmente ad espandersi attraverso il doppio strato promuovendo il *packing* delle catene aciliche e rendendo la membrana simile ad un gel. Al contrario, catene più corte, specialmente quelle con meno di 12 atomi di carbonio, non manifestano le stesse proprietà e non possono formare

interazioni idrofobiche con altri lipidi e proteine compromettendo, così, la fluidità di membrana;

- la variazione della proporzione tra isomeri *cis* e *trans*: l'aumento di acidi grassi insaturi *trans* riduce la fluidità di membrana e viene attuato da enzimi chiamati *cis-trans* isomerasi in un processo dipendente da energia (Chintalapati S., Kiran M.D. e Shivaji S., 2004).

Nei microorganismi psicrofili in generale, in particolare nei lieviti, l'introduzione di doppi legami sulla catena dell'acido grasso avviene post-traduzionalmente, attraverso una via di desaturazione di tipo aerobico che agisce sui lipidi di membrana. Si tratta di una reazione catalizzata dalle già note desaturasi che introducono un doppio legame alla volta tramite un evento che necessita di energia ed è specifico sia nei confronti della catena acilica dell'acido grasso che della posizione del doppio legame. I lieviti psicrofili che utilizzano una desaturazione degli acidi grassi di tipo aerobico hanno un vantaggio rispetto ad una via di produzione degli acidi grassi di tipo anaerobico, poiché la modificazione della catena acilica può avvenire indipendentemente dalla sua crescita (Morgan-Kiss R.M. et al., 2006).

Variazioni marcate riguardanti la composizione dei fosfolipidi e il grado d'insaturazione degli acidi grassi dei lieviti adattati al caldo e al freddo indicano che l'abilità di alterare questi componenti cellulari può costituire un meccanismo di adattamento in particolari ambienti e condizioni.

È stato dimostrato che esiste diretta correlazione tra l'adattamento alla temperatura e il grado d'insaturazione dei lipidi di membrana; minore è la temperatura maggiore il grado d'insaturazione degli acidi grassi inseriti nei fosfolipidi di membrana. L'alto contenuto di C18:2 e C18:3 nei lieviti psicrofili permetterebbe alle membrane cellulari di rimanere

in uno stato sufficientemente fluido, garantendo il funzionamento inalterato dei processi metabolici anche a temperature che scendono sotto lo zero.

Altri parametri oltre alla temperatura sono capaci di regolare la composizione della membrana lipidica. Questi, includono il pH, la composizione del mezzo di coltura, la fase di crescita e la concentrazione dell'ossigeno disciolto. Quest'ultimo aspetto è di particolare rilevanza nella regolazione del grado d'insaturazione dei lipidi alle varie temperature, poiché la solubilità dell'ossigeno diminuisce con la temperatura e l'ossigeno è necessario nelle reazioni che coinvolgono le desaturasi degli acidi grassi negli organismi psicrofili (Arthur H. e Watson K, 1976).

Capitolo 3

Parte prima: la vita nella criosfera

La criosfera è quella parte della Terra dove l'acqua è in forma solida, come neve o ghiaccio. Questa comprende vaste aree di mari e laghi ghiacciati, ghiacciai di montagna ed intere lande polari artiche ed antartiche completamente rivestite dal ghiaccio. Viste le condizioni climatiche estremamente severe, questi ambienti sono stati considerati per molto tempo inospitali e privi di ogni forma di vita o, in alternativa, serbatoi temporanei di microrganismi trasportati accidentalmente in questi luoghi dal vento e dalla neve e rimasti intrappolati nel ghiaccio (Cowan and Tow 2004). Tuttavia, grazie al crescente numero di studi intrapresi sull'ecologia microbica di questi habitats estremi e focalizzati sulla biodiversità del ghiaccio naturale, tale punto di vista è stato presto sovvertito, dimostrando, al contrario, che ambienti permanentemente freddi possono accogliere forme di vita anche in modo stabile. In questo modo, la criosfera, che aveva già acceso interessi poiché componente fondamentale nel mantenimento del sistema climatico globale, è stata riscoperta anche come uno dei principali ecosistemi abitabili della terra, ovvero, luogo capace di accogliere biotopi microbici altamente specializzati e, talvolta, altamente localizzati, tutti, caratterizzati dal mantenimento di uno o più condizioni ambientali estreme (basse temperature, fluttuazioni ampie di temperatura, essiccazione della materia minerale del suolo, ipersalinità, flussi periodici di radiazioni ad alta energia, bassa disponibilità di nutrienti).

I microrganismi di questi biotopi cominciarono ad incuriosire i ricercatori/esploratori anzitutto per i motivi che garantivano loro la sopravvivenza a temperature tanto basse (Abyzov, 1993; Ma *et al.*, 1999, 2000; Christner *et al.*, 2000; Poglazova *et al.*, 2001; Reeve *et al.*, 2002; Gunde-Cimerman *et al.*, 2003; Mader *et al.*, 2006) e fu Deming nel

2002, a definire per la prima volta le popolazioni batteriche isolate da habitats eternamente freddi- quali i ghiacciai Artici ed Antartici, le lande eternamente ghiacciate della Patagonia e gli alti ghiacciai di montagna- come psicrofili obbligati.

Priscu e Christner nel 2004 calcolarono il numero totale di cellule batteriche in Antartide e nei ghiacci della Groenlandia, questo era pari a $9,61 \times 10^{25}$ e corrispondeva ad un pool di carbonio molto significativo, uguale a $2,65 \times 10^{-3}$ Pg (1 Pg = 10^{15} g); essi, furono fra i primi ad intuire che le popolazioni di psicrofili delle lande ghiacciate ed isolate, rappresentavano uno dei maggiori serbatoi di diversità microbica presente sulla biosfera.

Lieviti psicrofili isolati dai ghiacciai alpini

Si definiscono psicrofili obbligati organismi aventi un optimum di crescita a 15°C, un massimo di tolleranza di 20°C ed un minimo di 0°C o forse anche inferiore. Altri organismi che crescono con valori di temperatura vicini a 0°C, ma con un optimum di sviluppo fra 20 e 30°C, sono piuttosto definiti psicrofili facoltativi o in altro modo psicrotolleranti (Cavicchi & Tortsen, 2000; Raspor & Zupan, 2006). I lieviti psicrofili facoltativi hanno evoluto forme genetiche di tolleranza al freddo, ma non si possono considerare fisiologicamente specializzati quanto gli psicrofili obbligati (Gounot, 1976).

La diversificata vita microbica degli habitats glaciali è stata ampiamente documentata. Anzitutto popolazioni batteriche sono state isolate dagli strati subglaciali dei ghiacciai politermali delle regioni Artiche dell'Alaska, a Nord del Canada (Skidmore et al., 2000, 2005; Bhatia et al., 2006) nonché sulle Alpi della Nuova Zelanda (Foght et al., 2004). Più recentemente, de Garcia et al. (2007) hanno isolato popolazioni vitali e complesse di lieviti dalle acque di scioglimento dei ghiacciai della Patagonia Argentina. Cellule di lievito vitali sono state pure isolate dai diversi strati

di ghiaccio dei ghiacciai Artici delle isole Svalbart (Norvegia) (Butinar *et al.*, 2007). Infine è stato riferito accuratamente sulla presenza di organismi cellulari "neri" della specie di *Aureobasidium pullulans*, simili ai lieviti per le loro caratteristiche morfologiche, fra gli strati basali dei ghiacciai Artici (Gostincar *et al.*, 2006).

Per quanto concerne i ghiacciai Alpini dell'Europa occidentale, le prime popolazioni batteriche vitali sono state ivi osservate nel 1999 in sedimenti subglaciali provenienti dalle Alpi del fronte svizzero (Sharp *et al.*, 1999). Qualche anno dopo, Margesin *et al.*, confermarono l'evidente presenza di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, così come sono gli stessi lieviti, nei ghiacciai Alpini (Margesin *et al.*, 2002). Infine, il Prof Pietro Buzzini nel 2005 riferì dell'esistenza di cellule di lievito vitali nelle acque di scioglimento dei ghiacciai Alpini Italiani (Buzzini *et al.*, 2005). Questi, sono stati trovati in concentrazioni rilevanti, paragonabili a quelle dei funghi filamentosi, tuttavia meno significative di quelle dei batteri in generale, che rappresentano la popolazione microbica prevalente degli habitats estremi.

La letteratura sin'ora presente, fornisce solo notizie parziali in merito alla biodiversità propria della popolazione di lieviti psicrofili dei ghiacci Alpini così, sempre Buzzini nel 2007 isolò e caratterizzò dal punto di vista molecolare i lieviti psicrofili che aveva isolato dai sedimenti sopra- e sub-glaciali, dagli strati di ghiaccio e dalle acque di scioglimento di due ghiacciai Alpini Italiani, Forni e Sforzellina (*figura 1*) (Turchetti *et al.*, 2007). In questo modo, si scoprì che una frazione significativa dei lieviti isolati, mostrava a 4°C una o più attività enzimatiche extracellulari (attività amido-degradante, lipolitica, esterolitica, proteolitica e pectinolitica).

In totale, 106 ceppi furono isolati dai ghiacciai alpini, ed identificati mediante tecniche di MSP-PRC fingerprinting come pure attraverso il sequenziamento delle regioni D1/D2 della subunità 26S dell'rRNA. Le specie, cui i 106 ceppi di lievito

sono risultate appartenere, erano 10: *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus gilvescens* (oltre il 50% del totale), *Cryptococcus terricolus*, *Mrakia gelida*, *Naganishia globosa*, *Rhodotorula glacialis*, *Rhodotorula psychropholica*, *Rhodotorula bacarum*, *Rhodotorula creatinivora* e *Rhodotorula laryngis*. Infine, stati isolati quattro ceppi appartenenti a nuove specie di lievito, che debbono ancora essere descritte.

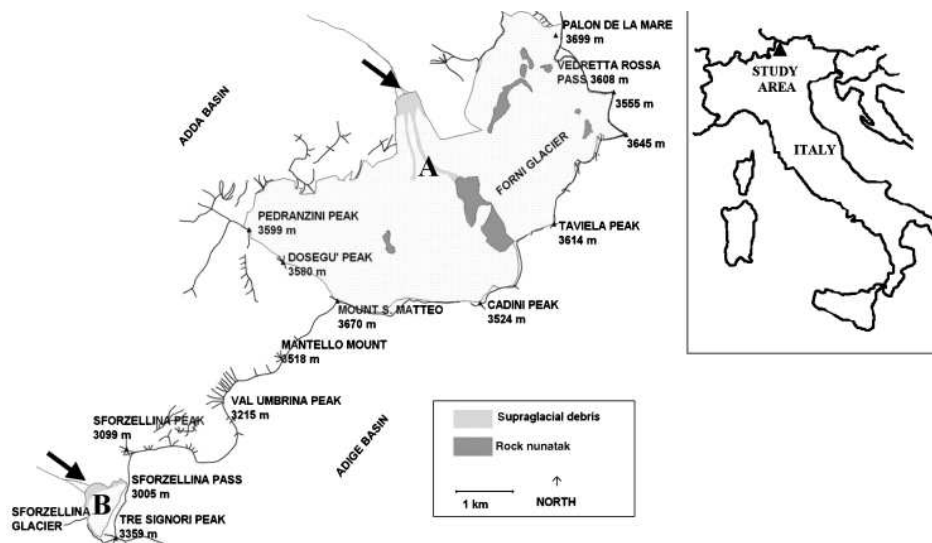


Fig.1. Localizzazione dei ghiacciai Forni (a) e Scorzellina (b) dai quali sono stati isolati i lieviti psicrofili oggetto di questo studio. Le frecce indicano le aree di campionamento.

Dai 106 lieviti psicrofili appartenenti alla collezione DBVPG dell'Università di Perugia, sono stati scelti, in modo random, 40 ceppi, di cui 20 fra gli obbligati e 20 fra i facoltativi e sono divenuti l'oggetto della presente ricerca.

Le risposte genetiche al freddo

Per riuscire a colonizzare con successo ambienti considerati estremi per i valori esibiti di temperatura media, i microrganismi psicrofili hanno dovuto evolvere forme adeguate di risposte genetiche al freddo, concretizzate in 3 comportamenti principali: la risposta di stress o "cold shock response", l'acclimatazione e finalmente l'adattamento vero e proprio.

Il tempo in cui il microrganismo resta esposto ad una temperatura di sviluppo "sub-ottimale", è determinante per interpretare l'effetto che quella può avere sulla fisiologia microbica. Quando la temperatura vira bruscamente verso valori sub-ottimali, allora, il microrganismo risponde scatenando reazioni rapide e fortemente dinamiche, vere e proprie risposte di stress. Se l'esposizione è invece più prolungata, almeno di un lifetime, allora si attivano quei meccanismi di regolazione che "aggiustano" per intero l'espressione genetica e quindi lo stato fisiologico del microrganismo. Quando, infine, il tempo di esposizione dura più generazioni consecutive, la naturale selezione evolutiva degli alleli interviene per aumentare l'affinità del microrganismo per quella specifica nicchia ecologica; questo comportamento genetico è detto adattamento (Morgan-Kiss et al., 2006).

E' certo che l'abilità dei lieviti a sopravvivere in ambienti glaciali ha attirato grandi interessi, ciononostante, i meccanismi, genetici o non, attraverso i quali tale fenomeno diventa possibile, non sono ancora stati compresi. Tuttavia, molti studi sono stati compiuti su questo argomento focalizzandosi però sui mesofili, decisamente più noti e versatili degli psicrofili, in particolare sulla specie *Saccharomyces cerevisiae*. L'abbassamento della temperatura dai 0°C ottimali a 12°C, modificherebbe il livello trascrizionale di diversi geni di *S. cerevisiae*, in particolare di quelli coinvolti nella regolazione dei trasportatori di nutrienti limitanti la crescita; nel metabolismo del glicogeno; nella biogenesi del ribosoma e delle proteine ribosomali. La biosintesi del metabolita trealosio sembrerebbe pure coinvolta nella risposta allo shock termico, sebbene non lo sia quando si innescano fenomeni di acclimatazione in sostituzione di quelli di adattamento vero e proprio. E' stato inoltre verificato il coinvolgimento, nella risposta al freddo, di un ben definito gruppo di geni principalmente implicato nel metabolismo lipidico in *S. cerevisiae*: in particolare, la $\Delta 9$

desaturasi, enzima chiave nella sintesi di acidi grassi insaturi ed unica desaturasi nota in *S. cerevisiae*, è over-espressa a temperature di sviluppo sub-ottimali (Martin CE et al., 2007; Nakagawa Y et al., 2002; Stuke, JE et al., 1989). I cambiamenti nel metabolismo lipidico sono le maggiori risposte genetiche attraverso cui si attuano l'acclimazione e l'adattamento al freddo nei microrganismi in generale, ciò è spiegato dalla necessità di mantenere l'appropriato stato fisiologico dei lipidi e quindi la funzionalità delle membrane lipidiche, altrimenti compromesse a temperature vicine a quella di congelamento (Los DA et al., 2004; Morgan-Kiss et al., 2006).

Caratteristiche dei ghiacciai colonizzati dai lieviti psicrofili

Il ghiacciaio Forni (*figura 1*) è il più grande ghiacciaio Italiano. Vanta un'estensione di circa 12km² di superficie, ha un'altezza compresa tra 2600m e 3670m slm mentre lo spessore del ghiaccio è di circa 100m (Merlanti et al., 1995). Il ghiacciaio ha raggiunto la sua massima estensione tra il 1550 e il 1850, dopo questo periodo ha subito un lento e quasi ininterrotto ritiro insieme ad un assottigliamento progressivo, conseguenze del continuo aumento della temperatura media del pianeta. Così, tra il 1925 ed il 2005, il ghiacciaio si è ritirato di almeno 20 metri all'anno assottigliandosi tra il 2000 e il 2005 di almeno 3m per anno. Il ghiacciaio Sforzellina (*figura 1*) ha invece una forma circolare e copre una superficie di circa 0,3 km², ha un'altezza compresa tra 2850 e 3050m slm, infine il ghiaccio ha uno spessore di circa 30m (Pavan et al., 2000). Purtroppo, anche questo ghiacciaio si è progressivamente ridotto nel corso del 20° secolo subendo un ritiro medio tra il 1925 e il 2005 di almeno 5m all'anno ed un assottigliamento progressivo fino a 1,2m per anno, misurato fra il 2000 ed il 2005.

Raccolta dei campioni

Tutti i campionamenti sono stati effettuati dal gruppo guidato dal Prof Pietro Buzzini dell'Università di Perugia. Sono stati compiuti nel mese di Agosto, nel corso di 2 anni consecutivi (2004 e 2005), prelevando ogni volta da siti diversi di campionamento, distanti molti metri l'uno dall'altro e dagli stessi margini esterni del ghiacciaio.

Con ogni campionamento si estraevano circa 500 g di sedimenti subglaciali incontaminati che venivano raccolti dopo aver rimosso almeno 5 cm di ghiaccio di superficie, così che fosse campionata solo la parte fresca ed incontaminata. I sedimenti subglaciali sono, nello specifico, zone di movimento fra strati di ghiaccio contigui. Con ogni spedizione sul ghiacciaio si estraevano e portavano via fino a 5 kg di sedimenti subglaciali totali. Inoltre venivano raccolte aliquote (500 ml) di acque di scioglimento degli stessi, per un volume totale di 15 L per volta. Sia i sedimenti subglaciali che le acque di fusione venivano conservati a 4°C fino al momento delle analisi di laboratorio, che si effettuavano per prassi, sempre entro le 72-96 ore successive. Infine, effettuando carotaggi in prossimità dei sedimenti subglaciali fino ad una profondità di circa 30 cm dalla superficie, venivano prelevati almeno 300 g di campioni di ghiaccio basale. Le carote di ghiaccio erano conservate a -18°C in ghiaccio secco ed analizzate in laboratorio entro le 24-30 successive.

Le analisi chimico fisiche effettuate sui campioni di ghiaccio e sulle acque di scioglimento consistevano anzitutto nel registrare caratteristiche quali massa secca, pH, contenuto di carbonio, azoto e fosforo, utilizzando procedure convenzionali (Hunt & Wilson, 1986; Mudroch *et al* 1996).

Analisi microbiologiche

Dal momento che tutti i campionamenti *in loco* erano stati effettuati in condizioni accuratamente asettiche, giunti in laboratorio, si potevano evitare tutte le altrimenti dovute

procedure di decontaminazione, che tuttavia, erano ugualmente previste solo per le carote di ghiaccio al fine di escludere la presenza di qualsivoglia microrganismo estraneo che avrebbe potuto contaminare il campione durante le procedure di perforazione, localizzandosi sulla superficie esterna delle carote estratte.

L'enumerazione dei lieviti coltivabili è stata poi effettuata secondo le linee guida suggerite da Buzzini *et al.* (2005), facendo uso di tre diversi substrati: Rosa Bengala agar (RB) + tetraciclina; Dicloran 18% glicerol agar (DG18); Dicloran Rosa Bengala agar (DRB) + cloramfenicolo.

Per quanto concerne il trattamento dei campioni liquidi (acque di fusione o acque raccolte nel corso del perforamento delle carote di ghiaccio), questi, venivano anzitutto filtrati usando pori da 0,22 µm di diametro, per poi essere distribuiti asepticamente e in ugual parti su due diverse petri, incubate una 4°C e l'altra a 20°C, per 12 o per 3 settimane, rispettivamente.

I campioni di ghiaccio solido (sedimenti sia sopra- che subglaciali) venivano, invece, diluiti usando una soluzione sterile contenete lo 0,1% di sodio pirofosfato. Diluizioni seriali erano distribuite su petri in quantità opportune ed infine le piastre venivano incubate a due diverse temperature (4°C e 20°C).

Determinazione delle attività enzimatiche extracellulari dei lieviti isolati

Un totale di 73 ceppi di lievito, rappresentativi di tutti quelli isolati, sono stati saggiati per la capacità di secernere in ambiente extracellulare enzimi ad attività idrolitica (amilasi, proteasi, lipasi, esterasi, pectinasi, cellulasi e chitinasi). Le procedure di analisi sono state descritte da Buzzini & Martini, 2002; Brizzio *et al.*, 2007; da de Garc'ia *et al.*, 2007.

Isolamento e preliminare clusterizzazione dei lieviti isolati

La crescita microbica sulle piastre petri veniva controllata periodicamente ed ogni colonia di lievito cresciuta trasferita su terreni di RB, senza tetraciclina, per poterla purificare. Le colonie erano selezionate e discriminate sulla base delle loro caratteristiche morfologiche e delle diverse temperature di incubazione. Tutti i microrganismi isolati, nel modo descritto, sono stati depositati nella *Industrial Yeasts Collection* DBVPG (www.agr.unipg.it/dbvpg).

In via del tutto preliminare, i lieviti isolati sono stati registrati attraverso una serie di prove fenotipiche convenzionali, basate solo sulle caratteristiche morfologiche macroscopiche e microscopiche mostrate dai ceppi esaminati: diazonio Blu B (DBB) test, capacità di fermentare il glucosio, assimilazione del carbonio (succinato, inulina, glucitolo), utilizzo del nitrato, e infine capacità di crescere a diverse temperature (4, 10, 15, 20, 25, 30 e 37 °C), ed eventualmente in assenza di vitamine (Yarrow, 1998).

Identificazione molecolare dei lieviti isolati

Per l'identificazione molecolare dei ceppi di lievito isolati dai ghiacciai alpini, il DNA genomico è stato estratto ed analizzato mediante tecniche di MSP-PCR finger printing (Libkind *et al.*, 2003) e in accordo con Sampaio *et al.* (2001) e Gadanho & Sampaio (2002), il Prof Buzzini (Turchetti *et al.*, 2008) ha clusterizzato i ceppi che presentavano identici profili di bande separate di DNA, considerandoli appartenenti alla medesima specie.

In questo modo, come già riferito, 106 ceppi di lievito sono stati isolati ed identificati, di questi, almeno il 55% proveniva da sedimenti subglaciali, che accoglie, infatti, la maggiore popolazione di lieviti vitali estremofili calcolata da 100 a 1000 volte più numerosa, in individui, di quella presente, ad esempio, nelle acque di fusione.

La caratterizzazione dei ceppi mediante MSP-PCR, ha mostrato 29 profili distinti di DNA finger printing. Tutte le sequenze

ottenute sono state depositate nella GenBank database (National Center for Biotechnology Information) e sulla base delle somiglianze genetiche fra le regioni D1/D2 della subunità 26S dell'rRNA, i ceppi di lievito sono stati collocati, in accordo con la classificazione dei basidiomiceti (cui appartengono oltre il 90% dei lieviti identificati), fra gli Imenomiceti, Uredinomiceti e Ustilaginomiceti (Fell et al., 2000).

Non stupisce che sia proprio il genere dei basidiomiceti quello che ha colonizzato con maggior successo queste nicchie ecologiche estreme, poiché si tratta di lieviti dotati di una capsula polisaccaridica esterna che fungendo da interfaccia tra le cellule e l'ambiente esterno inospitale, di fatto, le protegge.

Il sequenziamento delle regioni D1/D2 dell'rRNA subunità 26S eseguito sui ceppi più rappresentativi, ha permesso anche che questi fossero assegnati alle seguenti specie: *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus gilvescens*, *Cryptococcus terricolus*, *Rhodotorula creatinivora*, *Mrakia gelida*, *Naganishia globosa*, *Rhodotorula bacarum*, *Rhodotorula laryngis*, *Rhodotorula glacialis* e *Rhodotorula psychrophenolica*.

La specie più frequentemente presente è risultata essere quella di *Cryptococcus gilvescens* (51,2% del totale dei ceppi), mentre *Rhodotorula glacialis* e *Mrakia gelida* rappresentano il 15,1% e il 13,2% del totale dei ceppi, rispettivamente (figura 2). Sedici ceppi sono stati identificati come appartenenti alla specie di *Rhodotorula glacialis*, cinque a *Rhodotorula psychrophenolica*. Due ceppi della collezione, DBVPG 4736 e DBVPG 4804, sono stati classificati con il nome di *Naganishia globosa*. Quattro ceppi di lievito, infine, sono stati classificati come *Leucosporidium sp.*; la loro formale designazione tassonomica è tuttora in corso.

Nel complesso, è dei sedimenti subglaciali e, in minor misura, delle acque di scioglimento, la maggiore biodiversità di popolazione di lievito trovata.

Tutti i lieviti isolati sono stati in grado di crescere a 4, 10 e 15°C, ma nessuno sviluppava a 37°C. Per tutti i ceppi appartenenti alle specie *A. pullulans*, *C. terricolus* e *R. laryngis*, 30°C rappresenta il limite superiore di temperatura di sviluppo, mentre tutti gli isolati delle specie di *C. gilvescens*, *N. globosa*, e *R. creatinivora* crescono a 25 ma non a 30°C. Il limite superiore di temperatura, per tutti i ceppi di *R. bacarum*, *R. glacialis*, e *R. psychrophenolica* è di 20°C, infine, tutti i ceppi di *M. gelida*, così come quelli appartenenti al genere *Leucosporidium sp.*, crescono a 15°C, ma non a 20°C.

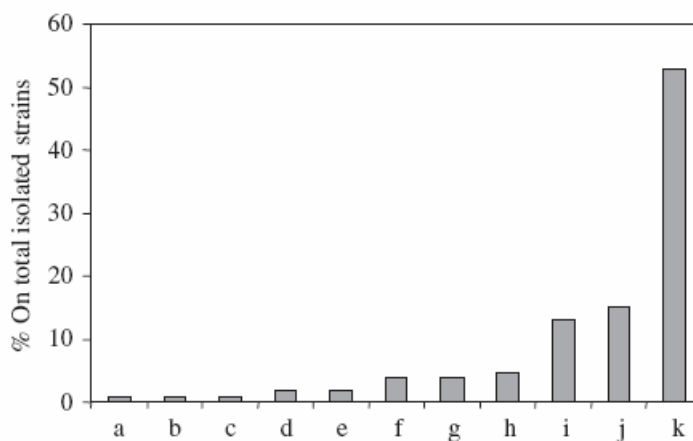


Fig.2. Frequenza delle specie di lievito trovate nel presente studio. (a) *Aureobasidium pullulans*; (b) *Rhodotorula creatinivora*; (c) *Rhodotorula bacarum*; (d) *Naganishia globosa*; (e) *Cryptococcus terricolus*; (f) *Leucosporidium sp.*; (g) *Rhodotorula laryngis*; (h) *Rhodotorula psychrophenolica*; (i) *Mrakia gelida*; (j) *Rhodotorula glacialis*; (k) *Cryptococcus gilvescens*.

Parte seconda: i lieviti mesofili

I lieviti sono organismi eucarioti filogeneticamente affini ai funghi filamentosi ma con struttura unicellulare. Hanno generalmente forma ovoidale o sferoidale, tuttavia alcuni si presentano allungati mentre altri hanno forma di ife filamentose (pseudomicelio). L'ordine di grandezza è di 5-30µm in lunghezza e di 1-5µm di larghezza.

In generale sono detti lieviti mesofili quelli aventi un optimum di temperatura tra 25 e 30°C, un massimo a circa 40°C ed un minimo che si aggira intorno a 0°C e +5°C. L'optimum di pH è compreso tra 4 e 4.5 con un minimo ad un valore di circa 3 ed un massimo intorno a 7. Generalmente, i lieviti di questa categoria tollerano bene ambienti con concentrazioni zuccherine del 20 e 25%, al di sopra delle quali si creano condizioni per un'elevata pressione osmotica che provoca prima un rallentamento dello sviluppo e successivamente la morte della cellula stessa; solo il genere *Zygosaccharomyces* è in grado di sopportare concentrazioni di zuccheri pure al di sopra del 60%. I lieviti mesofili, possono pertanto definirsi microrganismi osmofili, non hanno invece caratteristiche tali da poterli considerare anche alofili, cioè, non resistono neanche a concentrazioni modeste di sale.

Sono note oltre 800 specie di lieviti con queste caratteristiche, e probabilmente molte altre devono ancora essere scoperte.

Fatta eccezione per gli appartenenti al genere *Schyzosaccharomyces*, che si riproduce per fissione, i lieviti si riproducono, in genere, per gemmazione.

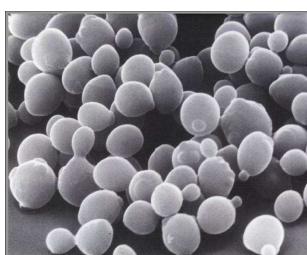


Fig.3. Lieviti in gemmazione.

In alcune specie si osserva una riproduzione sessuale che prevede la formazione di spore. In base alla morfologia di sporificazione si distingue in ascomiceti e basidiomiceti: i primi producono spore racchiuse in un corpo fruttifero o asco, i secondi formano, invece, spore all'esterno di un corpo fruttifero detto basidio.

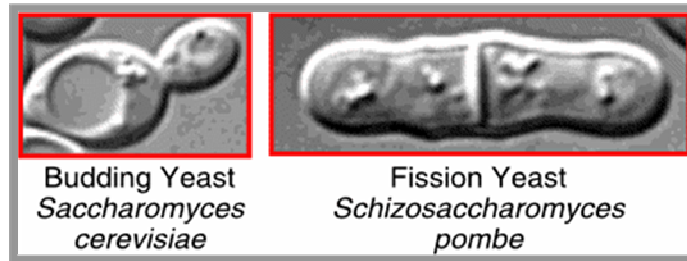
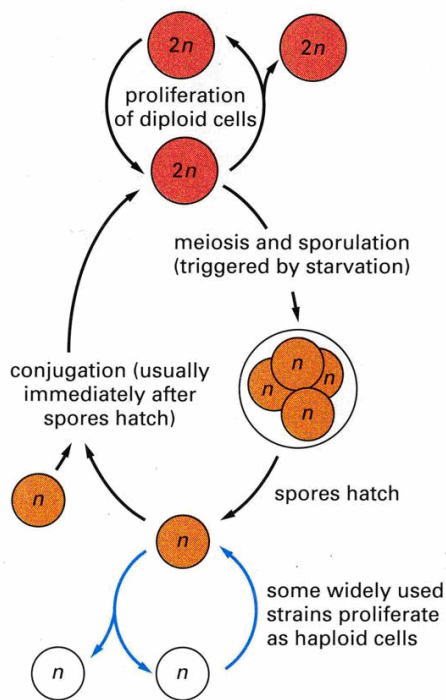


Fig.4. Lieviti che si riproducono per gemmazione (*S. cerevisiae*) o per fissione (*S. pombe*).

Le cellule eucariotiche possono esistere in due forme: aploide o diploide. I lieviti hanno due diverse forme di cellule aploidi, chiamate "tipi sessuali" o mating type. Possono quindi esistere: aploidi con mating type a ; aploidi con mating type α ; diploidi a/α .

Gli aploidi si dividono mitoticamente per produrre colonie



aploidi stabili, ed aploidi di mating type opposto possono coniugare e formare diploidi.

I diploidi si dividono mitoticamente per formare colonie diploidi stabili, entrano in meiosi e quindi sporificano producendo 4 spore aploidi o tetrade. Sia dal punto di vista economico che quantitativo i lieviti rappresentano il più importante gruppo microbico che sia mai stato commercialmente utilizzato dall'uomo.

Fig.5. Ciclo vitale dei lieviti.

La quantità totale di lievito prodotta è dell'ordine di alcuni milioni di tonnellate annue.

Gli usi industriali più comuni sono i seguenti:

- ◇ produzione di bevande alcoliche (vino, birra, liquori e sidro) ed etanolo per usi industriali ed alimentari;
- ◇ produzione di pane e prodotti da forno (500'000 ton. annue);
- ◇ produzione di proteine microbiche (SCP) per alimentazione umana ed animale;
- ◇ produzione di enzimi (invertasi), nucleotidi, steroli, lipidi, coenzimi ed RNA;
- ◇ produzione di proteine eterologhe mediante la tecnologia del DNA ricombinante (insulina, interferoni, somatostatina ecc.).

I due generi di lieviti di maggior interesse commerciale sono *Saccharomyces* e *Candida*; la specie più importante è sicuramente *S.cerevisiae*. Di elevato interesse sono anche *Kluyveromyces marxianus* per la produzione di lievito e alcool a partire da siero di latte; *Endomycopsis fibuligera* e *Candida utilis* per la produzione di proteine microbiche nel processo Symba (che prevede l'uso di sottoprodotti della lavorazione della patata e del mais con il duplice scopo di abbattere il BOD - Biological Oxygen Demand- e di produrre SCP - Single Cell Protein -); *Candida utilis*, viene pure molto utilizzata per produrre SCP da altri sottoprodotti, quali borlande di distilleria e acque residue delle cartiere (spent sulphite liquor); *Candida lipolytica*, *C. tropicalis* e *C. maltosa* sono state usate per produrre proteine da n-paraffine mentre *Schvanniomyces* sp. prevede l'uso di materiale amidaceo.

I lieviti di interesse industriale vantano un metabolismo energetico di tipo ossidativo aerobico. Alcuni, come *S. cerevisiae*, posseggono un metabolismo ossidativo accanto ad uno fermentativo; altri, invece, come *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodotorula* e *Hansenula* usano solo un metabolismo ossidativo; altri ancora, come ad esempio *Pichia* hanno forte attività ossidativa e debole capacità fermentativa.

A discriminare, lì dove è possibile, fra un metabolismo ossidativo ad uno fermentativo, è la disponibilità di ossigeno in coltura. In presenza di ossigeno, il lievito si moltiplica attivamente producendo notevole massa cellulare (SCP) senza però dar luogo a fermentazione alcolica; in assenza di ossigeno il lievito avvia, invece, una fermentazione alcolica. Questo semplice comportamento nei confronti dell'ossigeno viene sfruttato industrialmente, nel primo caso, per la produzione industriale di biomassa di lievito e nel secondo nell'industria della birra, dell'alcool e in enologia. L'inibizione della fermentazione alcolica da parte dell'ossigeno è noto come effetto Pasteur. Una delle ipotesi attualmente sostenute per spiegare l'azione inibente dell'ossigeno attribuisce una competizione fra processo fermentativo e respirazione per il fosfato inorganico e l'ADP presente nel mezzo onde formare ATP. In altre parole, quando il processo respiratorio è molto intenso il fosfato inorganico viene immagazzinato nell'ATP con notevole diminuzione dell'ADP disponibile per il processo fermentativo.

La fonte di carbonio può essere costituita da uno zucchero semplice come il glucosio o il saccarosio, da acidi organici o aldeidi. Il potere fermento è il rapporto fra il peso del lievito prodotto e quello dello zucchero consumato; in abbondante aerazione tale rapporto è 1/4 (cioè si forma 1 grammo di cellule secche ogni 4 grammi di zucchero consumato) mentre in stretta anaerobiosi tale rapporto è 1/176. La concentrazione di glucosio può controllare lo sviluppo di un lievito, poiché, se la concentrazione del glucosio supera i valori fisiologici (0.01-0.02%) viene inibita la sintesi del citocromo a e quindi si può avere produzione di alcool anche in aerobiosi. Questo fenomeno noto come effetto Crabtree, spiega perché la produzione industriale di lievito, come biomassa (SCP), si ottiene mediante fermentazione continua mantenendo la concentrazione zuccherina entro i valori indicati.

L'azoto deve essere somministrato come NH_4^+ (sali ammoniacali) o sotto forma di aminoacidi (miscele), peptoni, urea o amidi. Fra le vitamine, la più importante è la biotina di cui tutti i lieviti necessitano, quindi l'acido pantotenico, la tiamina, l'inosite, la piridossina e l'acido nicotinico. Nessun lievito ha bisogno di riboflavina.

Parte terza: *Schizochytrium limacinum* SR21

Schizochytrium limacinum SR21 è un microrganismo marino eterotrofo identificato nelle acque delle mangrovie in prossimità delle isole dello Stato della Micronesia nel Pacifico occidentale, nel 1994 (IFO 32693). Appartiene alla famiglia dei Thraustochytriidae, ordine Labirinthulida, dell'American Type Culture Collection (Honda D et. al., 1998). Se osservate al microscopio ottico, queste appaiono come cellule sferiche, di 7-15 μm di diametro dotate di caratteristici elementi ectoplasmici ben visibili. Producono zoosporangi di 12-24 μm di diametro che rilasciano 16-64 zoospore ovoidali (6-8,5 μm in lunghezza e 5-7 μm di larghezza, con due flagelli laterali). In colture di acqua di mare, polline di pino e medium molto nutriente, le cellule vegetative formano cellule limaciformi ameboidi, con pseudopodi, in grado di produrre fino ad 8 zoospore. In terreno liquido, invece, le cellule vegetative si presentano sferiche (7-15 μm di diametro), e solitamente formano noti cluster.



Fig.6. Cluster di cellule vegetative con elementi ectoplasmici.

Quando sono coltivate su piastra, le colonie si presentano generalmente sferiche, ma si osservano anche colonie amorfe con margini molto allungati. Le cellule in stato vegetativo di *Schyzochitrium limacinum* SR-21, sono dotate di molti vacuoli sferici visibili, anche al microscopio ottico.

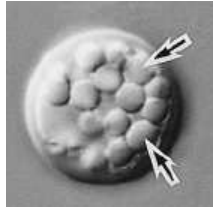


Fig.7. Cellule vegetative (2 settimane) contenenti diversi vacuoli sferici (freccie).

Dopo inoculo in terreno fresco, le dimensioni delle cellule vegetative aumentano, e si ha divisione nucleare ma non citochinesi.



Fig.8. Divisione nucleare senza citochinesi.

Colorando i nuclei con il DAPI e visualizzandoli con un microscopio a contrasto (Nomarski) e con un microscopio a fluorescenza, è possibile riconoscere la localizzazione stessa dei nuclei.

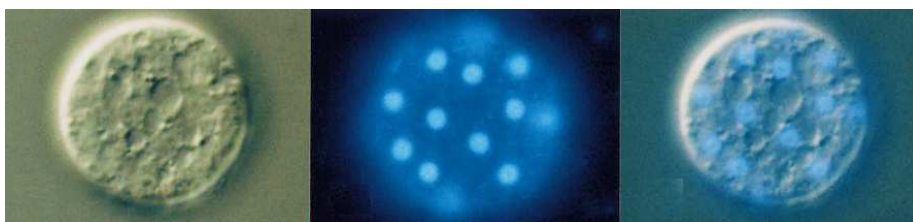


Fig.9. Localizzazione dei nuclei.

Da sinistra: immagine al microscopio a contrasto, microscopio a fluorescenza ed infine a destra sovrapposizione delle immagini.

Solo quando è stato superato questo stadio si ha citochinesi, quindi le cellule danno vita a zoosporangi (12-24 μm di

diametro), la parete dei quali, dopo 9-10 ore dall'inizio del processo, è persa e vengono rilasciate dalle 16 alle 64 zoospore.

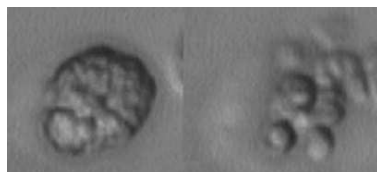


Fig.10. Rilascio di 16-64 zoospore dallo zoo sporangio.

Osservando da vicino tutto il processo, ecco quel che accade alla cellula vegetativa: trascorse 4-5 ore dall'inoculo in terreno fresco, le cellule subiscono divisione binaria, fino a formare un cluster di 16-32 cellule.

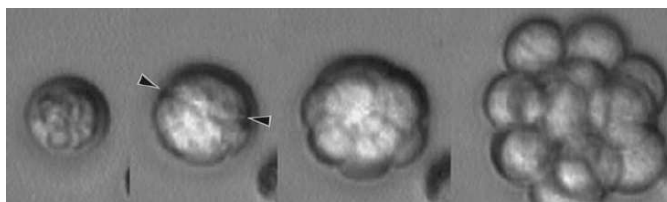


Fig.11. Divisione binaria di una cellula vegetativa, formazione di un cluster di 16-32 cellule.

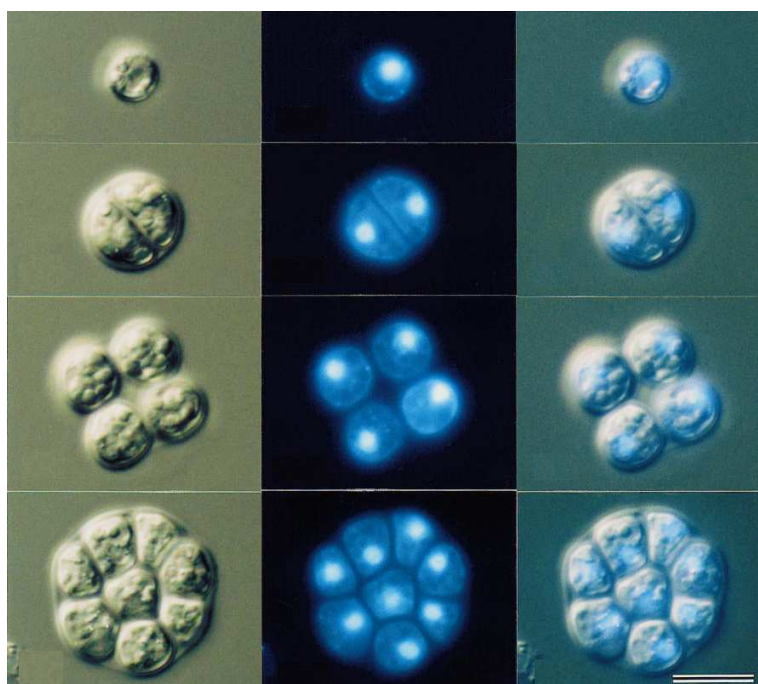


Fig.12. Divisione binaria di una cellula vegetativa fino alla formazione di un cluster di 16-32 cellule.

Trascorse circa 15 ore dall'inoculo, diverse cellule del cluster rilasciano cellule limaciformi ameboidi, ognuna con due nuclei (12-20 μm in lunghezza, 5-8 μm in larghezza). Queste sviluppano pseudopodi e strisciano con movimenti allungati e curvi sulla superficie. Dopo 30 minuti dal rilascio, le cellule si assestano, diventano tonde e dopo 3 divisioni cellulari consecutive rilasciano 8 zoospore ovoidi più piccole di quelle rilasciate direttamente dalle cellule vegetative (4,5-6 μm in lunghezza, 3,5-5 μm in larghezza).

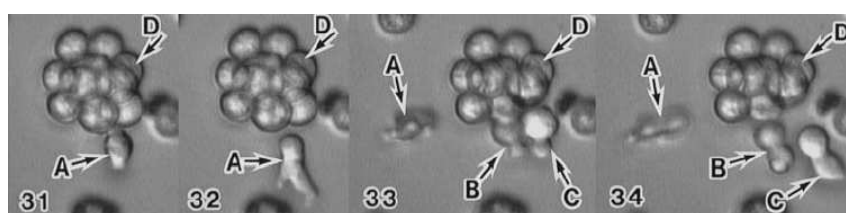


Fig.13. Cellule ameboidi rilasciano 8 zoospore ovoidi.

***Schizochytrium limacinum* SR21: un potenziale Single Cell Oil (SCO).**

Il ceppo SR21, che appartiene alla specie in esame, ha suscitato, soprattutto negli ultimi anni, interessi notevoli, questo, per la capacità di produrre acidi grassi polinsaturi (PUFA), fra cui principalmente l'acido docosoesanoico o DHA (22:6n-3) ed eicosopentanoico EPA (20:5n-6).

In questo microrganismo gli acidi grassi totali, possono rappresentare per oltre il 50% il peso secco della cellula e di quelli, ben il 30% circa, è da attribuire al solo contenuto di DHA (Morita et al. 2006). Ulteriori studi morfologici hanno concorso a dimostrare che i traustochitridi contengono numerosi corpi lipidici nei quali si ritiene si accumulino gli alti livelli di DHA. Sebbene la formazione dei corpi lipidici nelle alghe, cui appartiene anche il genere dei Labyrinturomycota, non sia stata ancora ben definita, si ritiene che queste strutture siano prodotte tramite gemmazione dal reticolo endoplasmatico, nel quale, infatti, risultano immerse, suggerendo la stretta correlazione fra queste ed il

reticolo endoplasmatico in ogni fase dello sviluppo della cellula.

I corpi lipidici sono altresì definiti come vescicole lipidiche e sono assemblaggi proteolipidici, diversi tra loro in dimensioni, composizione, biogenesi e proprietà cellulari, con un ruolo importante nell'immagazzinamento e nel metabolismo lipidico. Date le caratteristiche di molecole neutre gli acidi grassi nella forma di triacilgliceroli e steroli, sono accumulate nell'ambiente apolare interno delle vescicole, mentre i fosfolipidi, soprattutto fosfatidilcolina, sono immagazzinati nel doppio strato lipidico che delimita i corpi lipidi stessi.

Realizzando una coltura di zoospore con crescita sincrona, si osserva come queste siano equidimensionali fino a 8 ore dopo l'inizio dell'incubazione, e diventino eterogenee in dimensioni dopo l'ottava ora. Nello stesso tempo il parametro che valuta la frazione degli acidi grassi totali sul peso secco della biomassa cellulare (TFA/DCW, Total Fatty Acids/Dry Cell Weight), decresce nelle prime otto ore per poi aumentare progressivamente fino a raggiungere un valore di 0,25-0,30. Anche la composizione qualitativa dei lipidi cambia nel tempo: mentre i triacilgliceroli rappresentano costantemente, fin dal primo giorno, per il 70% gli acidi grassi totali, la fosfatidilcolina, il principale fosfolipide, tende invece a decrescere gradualmente (Morita *et al.*, 2006).

Il profilo degli acidi grassi di SR21 è dominato da tre forme principali: DHA-3, EPA-6 e acido palmitico (C16:0).

Il DHA e l'acido palmitico costituiscono oltre l'80% degli acidi grassi totali con quantità relative che variano leggermente nel tempo: nell'arco di 10 giorni, il DHA decresce in modo appena percettibile, mentre l'acido palmitico aumenta di poco. La composizione dei lipidi neutri non varia molto nei primi 10 giorni ed è, per il 50% circa, formata da solo acido palmitico saturo mentre, per il 35% circa, da DHA. Al contrario, la composizione dei fosfolipidi polari cambia drasticamente: il DHA passa dal 59,5%, dello stadio di

zoospora, all'8,7% delle colture di 10 giorni; l'acido palmitico passa, al contrario, dal 26,4% al 64,1%.

La colorazione con Nile red è stata sfruttata anche nell'evidenziare le variazioni delle dimensioni dei corpi lipidici durante un processo fermentativo. In questo modo, è stato possibile osservare che essi variano da meno di 1 μm , allo stadio di zoospora, fino a 2-3 μm dopo 10 giorni dall'inoculo.

La colorazione con Neutral red evidenzia, in aggiunta, che mentre aumentano le dimensioni dei corpi lipidici, dopo un giorno, diminuiscono i diametri dei vacuoli. Infine, il numero dei corpi lipidici tende ad aumentare dopo sole 4 ore di coltura, gradualmente, fino alle 12 ore.

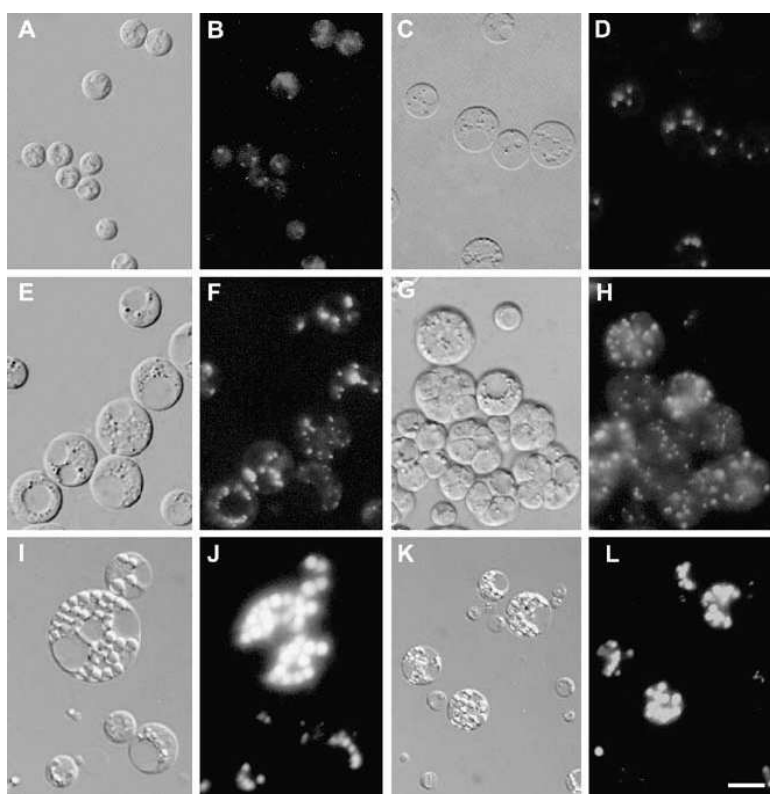


Fig.14. Sviluppo dei corpi lipidici evidenziato con colorazione Nile red. Zoospore (A,B) dello *Schizochytrium limacinum* SR21 coltivate per 4 h (C,D), 8 h (E,F), 12 h (G,H), 1 giorno (I,J), 10 giorni (K,L). Immagine a contrasto (A,C,E,G,I,K) e immagine a fluorescenza (B,D,F,H,J,L) delle stesse cellule. Scala barra = 10 μm . (Morita et al., 2006).

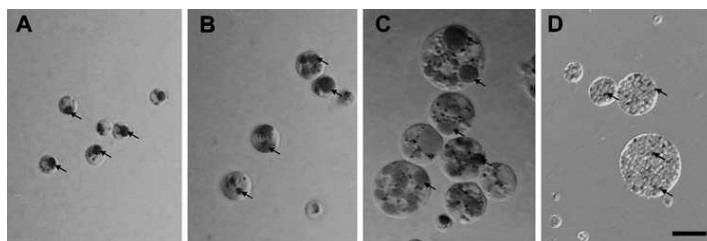


Fig.15. Colorazione dei vacuoli con Neutral red. (A) Zoospore di *Schizochytrium limacinum* SR21 coltivate per (B) 4 h, (C) 12 h, (D) 1 giorno. I vacuoli (frecche) diminuiscono in dimensione dopo un giorno di coltura. Scala barra = 10 μ m. (Morita et al., 2006).

I dati riportati suggeriscono l'esistenza di una correlazione tra la formazione di corpi lipidici e la sintesi lipidica durante la crescita sincrona. Nei periodi successivi le cellule diventano eterogenee in dimensione mentre i corpi lipidici aumentano insieme al rapporto acidi grassi totali/peso secco della biomassa. Lo studio di Morita et al. ha evidenziato, infine, che il rapporto tra acidi grassi saturi ed acidi grassi altamente insaturi è di circa 1:1 sui lipidi neutri di SR21 e che la variazione del contenuto in DHA nei fosfolipidi polari, è capace di condizionare le proprietà delle membrane lipidiche (Stillwell et al., 2003).

Parte quarta: le fermentazioni industriali

Sotto un profilo puramente biochimico il termine fermentazione si riferisce alla produzione di energia in assenza di ossigeno durante i processi catabolici. Dal punto di vista della microbiologia industriale, invece, la fermentazione è un processo aerobico o anaerobico in cui si creano le condizioni chimico-fisiche necessarie per la biotrasformazione di una serie di sostanze primarie in prodotti di interesse industriale o la biodegradazione di sostanze nocive in prodotti innocui attraverso l'azione controllata di microorganismi, cellule superiori o biocatalizzatori, come enzimi, in un sistema chiamato fermentatore o bioreattore.

I processi fermentativi possono essere sviluppati in colture sommerse in un medium liquido o su substrati solidi. La fermentazione in stato solido è quella in cui lo sviluppo microbico e la formazione di prodotto avvengono sulla superficie di substrati solidi. Trova applicazione specie nei paesi orientali in processi alimentari per la produzione di salsa di soia, koji, ecc. Più recentemente è stata usata per la produzione di enzimi extracellulari e di micotossine. Dal punto di vista industriale la fermentazione sommersa è di gran lunga la più usata. A seconda che la si effettui in un sistema chiuso, parzialmente aperto od aperto in continuo, i processi si possono dividere in: fermentazione discontinua (batch), discontinua alimentata (fed-batch), continua e continua con riciclo. Le modalità fermentative batch e fed-batch, sono senza dubbio quelle industrialmente più diffuse.

Nel nostro lavoro abbiamo utilizzato, definendoli di volta in volta sui ceppi di lievito in esame, processi in modalità discontinua.

Il processo batch, è caratterizzato dal fatto che il sistema è chiuso rispetto allo scambio di nutrienti o del brodo colturale con l'esterno, pertanto, dopo l'inoculo non si ha altro apporto di terreno fresco né fuoriuscita di brodo esausto dal fermentatore fino al recupero finale del prodotto. Tale sistema, per come è strutturato, permette la moltiplicazione delle cellule solo per un limitato periodo di tempo, durante il quale si verificano progressivi cambiamenti della composizione del terreno colturale. Quando lo sviluppo cessa, per mancanza di un nutriente, per accumulo di un prodotto metabolico tossico o per variazioni di pH, il terreno esausto viene raccolto e trattato per il recupero del prodotto di interesse (biomassa o metabolita).

Questo è il sistema fermentativo più usato nell'industria per la produzione di antibiotici, aminoacidi, enzimi ed altri prodotti.

La fase di latenza, lag phase, è il periodo di adattamento che segue l'inoculo del terreno e che la coltura microbica appena

inoculata richiede per riorganizzare i suoi costituenti molecolari e macromolecolari. Ciò, si attua attraverso la sintesi o la repressione di enzimi o componenti strutturali, per cui, la durata della fase lag può essere molto variabile. Durante questa fase la massa cellulare può cambiare senza che ci sia variazione nel numero delle cellule.

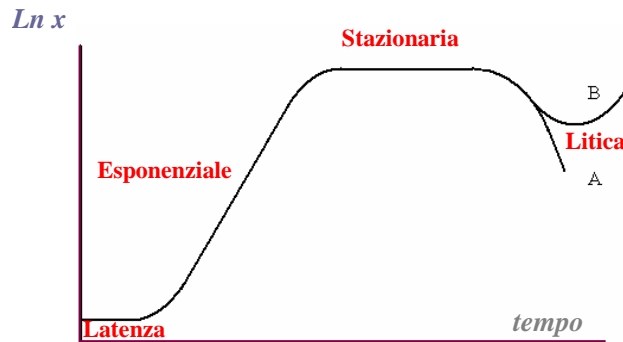


Fig 16. Curva di sviluppo di un microrganismo nel corso di una fermentazione discontinua

La fase esponenziale (log o exponential phase), è quella propriamente caratterizzata dallo sviluppo cellulare, durante la quale la velocità specifica di crescita (μ , espressa come h^{-1}) rimane costante ed assume il suo valore massimo. Tale parametro cinetico esprime la quantità di biomassa generata nell'unità di tempo dall'unità di biomassa ed è correlato al tempo di raddoppiamento cellulare (t_g):

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x$$

$$\frac{dx}{x} = \mu dt$$

integrando, si ottiene la seguente:

$$\int_{x_0}^x \frac{1}{x} dx = \int_{t_0}^t \mu dt$$

$$\ln x = \ln x_0 + \mu \cdot t$$

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t}$$

se t , è il tempo necessario perché $x = x_0$, cioè $t = t_g$, risulta che:

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_g} = \frac{0.693}{t_g}$$

Durante la fermentazione la composizione chimica del brodo colturale cambia per il consumo dei nutrienti, per l'accumulo di biomassa e per quello dei prodotti metabolici, invece la composizione macromolecolare della cellula rimane costante. La deplezione di un nutriente essenziale o l'accumulo di un metabolita inibente causano il calo della velocità di sviluppo fino al conseguimento della fase stazionaria dove l'equilibrio tra morte e sviluppo cellulare, fa sì che non si abbia generazione netta di biomassa ($\mu=0$). Quantunque la crescita sia cessata, può tuttavia esserci ancora metabolismo con accumulo di metaboliti o di enzimi nella cellula oppure nel terreno di coltura. Spesso metaboliti secondari, non essenziali, vengono sintetizzati proprio in questa fase da sistemi enzimatici che non sono presenti o funzionanti nelle precedenti fasi di sviluppo cellulare. Infine, le cellule capaci di sporulare producono spore in risposta a carenze nutritive o a fattori ambientali avversi.

La fase litica segue quella stazionaria ed è caratterizzata da lisi cellulare, evento che determina la diminuzione della biomassa in coltura ed insieme la formazione di un mezzo complesso, ricco dei prodotti della lisi, che può consentire un periodo di sviluppo secondario detto sviluppo criptico.

Effetto della temperatura sullo sviluppo microbico

Come già ricordato in uno dei paragrafi precedenti, oltre alla composizione del terreno colturale, numerosi sono i fattori ambientali che possono incidere sia sullo sviluppo cellulare che sulla formazione del prodotto. Dato l'argomento del presente lavoro, ci interessa ricordare che sulla base della temperatura ottimale di crescita, valore cui corrisponde la massima efficienza di crescita, i microrganismi si possono classificare in psicrofili (μ_{max} al di sotto di 20°C),

mesofili (μ_{max} fra 30 e 35°C) e termofili (μ_{max} al di sopra di 50°C) (figura 17).

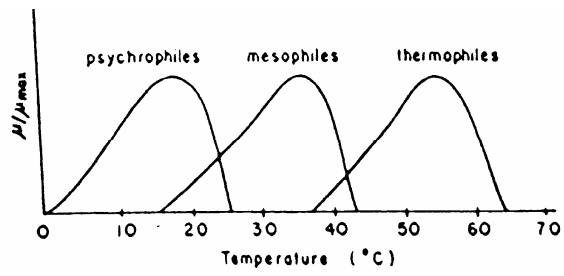


Fig.17. Effetto della temperatura sullo sviluppo microbico.

Capitolo 4

Metodi di analisi dei lipidi convenzionali e non

L'analisi dei lipidi si compone di tre fasi fondamentali:

- ✓ estrazione dei lipidi dalla cellula microbica
- ✓ idrolisi e derivatizzazione dei lipidi estratti
- ✓ analisi dei lipidi mediante gas-cromatografia.

La scelta del metodo, perché questo sia il più efficace possibile, deve essere necessariamente guidata dalla conoscenza della composizione e distribuzione lipidica delle cellule microbiche in esame.

Esistono in letteratura alcune strategie tradizionali per l'estrazione dei lipidi nei lieviti (Folch/Lees/Stanley, Bligh/Dyer, Ways/Hanahan). Se i lipidi sono liberi, è facile immaginarlo, sono prontamente estraibili. Se invece sono inseriti in membrane, la necessaria estrazione di questi dal double layer rende più complicata la procedura e l'efficienza del recupero influisce sull'analisi quantitativa e qualitativa finale.

L'analisi gas-cromatografica richiede la derivatizzazione dei gruppi carbossilici degli acidi grassi estratti dal primo pool lipidico complesso. Esistono tre possibili strategie: tradizionale (NaOH-KOH/MeOH), mediante catalisi basica (NaOH-KOH/CH₂N₂) oppure con una catalisi acida (14% BF₃/MeOH) (BMC biochemistry 2005). Queste, sono state tutte confrontate sui nostri campioni per individuare ed adottare finalmente quella procedura che risultava la migliore sulla base della sensibilità presentata e della qualità dei cromatogrammi ottenuti. L'ultima fra le tre indicate, la catalisi acida, è stata infine da noi scelta come strategia di derivatizzazione ottimale poiché dava cromatogrammi più puliti, picchi più risolti, più facile attribuzione degli stessi e minore rumore di fondo.

I metodi convenzionali per la determinazione dei lipidi nelle cellule microbiche, hanno molti passaggi complicati.

L'estrazione, la purificazione, la concentrazione e la determinazione, che richiedono molto tempo. Tuttavia il metodo Folch, che consiste di queste procedure, resta quello più impiegato.

Dopo le fasi di estrazione e di purificazione i lipidi vengono generalmente quali-quantificati mediante l'uso di un gascromatografo.

La gascromatografia

La cromatografia é una tecnica di separazione di vari componenti di una miscela. Fu ideata nel 1906 dal russo Tswett. La tecnica consiste nello sfruttare la diversa attitudine che ogni molecola o ione possiede nel distribuirsi tra due differenti fasi (una stazionaria e una mobile). Se una fase viene immobilizzata (fase stazionaria) e l'altra viene fatta scorrere sopra di essa (fase mobile, o "eluente"), é possibile condurre l'estrazione in modo continuo. Una specie chimica fatta passare in un sistema a due fasi si distribuirà infatti tra le due fasi, in misura proporzionale alla diversa affinità che possiede per esse, secondo le sue proprietà chimico-fisiche. La fase stazionaria può essere costituita da un solido, oppure un liquido, mentre la fase mobile é rappresentata da un fluido che scorre sopra la fase stazionaria, quindi un liquido o un gas.

Il tempo di ritenzione, è il tempo che una sostanza trascorre nella colonna. Dipende dall'affinità della sostanza per le due fasi. L'eluente (fase mobile) incontrerà una certa difficoltà nel trascinare con sé alcune sostanze, mentre altre, relativamente più affini ad esso e meno verso la fase stazionaria, verranno più facilmente dislocate dalle posizioni che occupano e trasportate verso la fine della colonna, separandosi sempre di più dalle sostanze maggiormente trattenute.

Con il procedere della separazione, le sostanze usciranno dalla colonna dopo un certo tempo di ritenzione, durante il

quale è fluìto un certo volume di solvente (volume di ritenzione). In uscita dalla colonna si disegna il "cromatogramma" del campione analizzato che riporta le concentrazioni di sostanza in uscita in funzione del tempo o del volume di eluente.

Dal primo esperimento di Cvet la tecnica si è estremamente evoluta. Oggi esistono vari tipi di cromatografie, generalmente classificate in funzione della natura delle fasi stazionaria e mobile, inoltre vi è un'ulteriore suddivisione basata sui meccanismi chimico-fisici che governano la separazione. Si distinguono così la cromatografia di affinità, di adsorbimento e ionica, nonché la cromatografia a permeazione di gel o ad esclusione molecolare (impiegata nella separazione dei polimeri in funzione del loro peso molecolare).

Esistono poi diverse tecniche cromatografiche: cromatografia su strato sottile (TLC), cromatografia su carta (PC), cromatografia su colonna a bassa pressione (LPC), cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC) ed infine la gas-cromatografia (GC).

La gas-cromatografia è una tecnica in cui la fase mobile è un gas che fluisce attraverso una colonna su cui è posta la fase stazionaria, la quale può essere un solido granulare poroso oppure un liquido. Secondo lo stato fisico della fase stazionaria, la gas-cromatografia si può suddividere in cromatografia gas solido (GSC) e in cromatografia gas liquido (GLC).

Questo metodo, che ha conosciuto un grande sviluppo a partire dagli anni '60, conserva tuttora una posizione di primo piano come tecnica analitica. L'unica limitazione della gas-cromatografia è la necessità di rendere volatili i campioni da analizzare, per cui in alcuni casi essa è soppiantata dall'HPLC.

I meccanismi di separazione relativi alla GC sono essenzialmente due: ripartizione, nel caso che la fase stazionaria sia liquida, e adsorbimento, quando è solida.

Un gas-cromatografo è costituito da alcuni elementi principali. Anzitutto da un sistema di alimentazione del gas di trasporto (carrier), che consiste semplicemente di bombole di gas inerte (azoto, elio, argon, talvolta idrogeno), il cui scopo principale è quello di trascinare i componenti della miscela in analisi lungo la colonna cromatografica. Qualora si utilizzi un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID), come avviene nel nostro caso, è necessario alimentare un combustibile ed un comburente (ad esempio idrogeno ed aria), quindi si necessita di un sistema ulteriore e specifico di alimentazione del gas comburente. L'iniettore anche detto camera di iniezione ha come compito quello di assicurare l'istantanea vaporizzazione del campione. Poiché con l'uso di colonne capillari la quantità di campione da iniettare è dell'ordine dei nanolitri, sono state messe a punto particolari tecniche di iniezione, che sfruttano sistemi di resistenze variabili per fissare la temperatura ritenuta più adatta alla vaporizzazione della miscela. L'introduzione del campione viene effettuata con una iniezione su un apposito disco di gomma al silicone, posto tra una ghiera metallica e il dispositivo di attacco alla colonna. Questa colonna può essere di due tipi: impaccata o capillare. L'impaccata (diametro interno 2-4 mm, lunghezza 1-4 m), usata nella gas-cromatografia classica, comporta una separazione in colonna di acciaio o di vetro riempita di materiale inerte (supporto per la fase stazionaria) sul quale è distribuita una pellicola sottile di liquido (fase stazionaria) continuamente attraversata da un gas (fase mobile) detto gas di trasporto. Il processo di separazione è però limitato dalla lentezza dell'eluizione delle molecole del campione lungo la colonna. La capillare (diametro interno 0,1-0,8 mm, lunghezza 10-100 m), ormai di uso comune, rappresenta un'importante innovazione

per la rapidità di eluizione che offre e per la migliore risoluzione che ne deriva. È molto più lunga dell'impaccata ma ha un diametro di gran lunga minore, contiene quindi una quantità inferiore di fase stazionaria, perciò la quantità di campione da iniettare è molto più piccola e viene eluita prima. Le colonne sono alloggiare in una camera termostatica, in genere a circolazione di aria calda. Sistema che assicura una buona stabilità di temperatura. Infine vi è il rivelatore, dispositivo in grado di rivelare la presenza di una sostanza estranea nel gas di trasporto, a valle della colonna. Questi si possono dividere in universali e selettivi. I primi consentono di individuare tutte le componenti di una miscela, i secondi rivelano solo particolari categorie di composti. Esistono tipi diversi di rivelatori: rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID), rivelatore a cattura di elettroni (ECD), rivelatore a termoconducibilità (HWD). Quello da noi impiegato è un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). Si tratta di un rivelatore universale ma distruttivo in quanto i campioni vengono bruciati per ottenerne la trasformazione in ioni allo stato gassoso. Il carrier è convogliato verso un ugello a cui giungono anche idrogeno ed aria, necessari per alimentare una piccola fiammella. Una resistenza posta accanto all'ugello provoca l'accensione della fiammella. Quest'ultima si trova circondata da un collettore cilindrico caricato positivamente; il secondo elettrodo del circuito, quello caricato negativamente, è costituito dall'ugello stesso. La microfiamma provoca una debolissima corrente ionica tra gli elettrodi, che vengono mantenuti sotto una differenza di potenziale di circa 300V. Questa corrente, elaborata, amplificata e misurata, viene inviata ad un opportuno registratore e costituisce il cosiddetto rumore di fondo. Quando un componente della miscela raggiunge la fiamma, viene subito ionizzato con conseguente aumento dell'intensità di corrente e quindi rivelato con un segnale più intenso. Come già detto questo rivelatore è di tipo universale, sono poche infatti le sostanze che hanno potenziali di ionizzazione così alti da non poter essere

ionizzate nelle normali condizioni di lavoro. La sensibilità di questo rivelatore é molto elevata, ordine dei nanogrammi. Il segnale in uscita dal rivelatore passa infine ad un registratore che ha il compito di realizzare il tracciato cromatografico. I moderni strumenti sono corredati anche di un integratore che permette il calcolo automatico delle aree dei picchi, operazione indispensabile per effettuare analisi di tipo quantitativo.

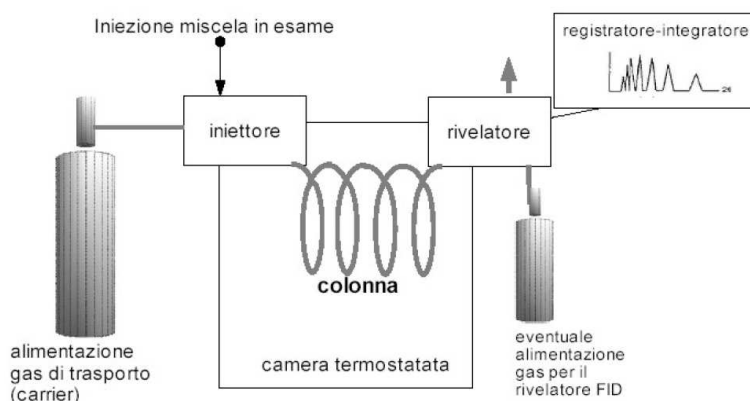


Fig.1. Schema di un gas-cromatografo.

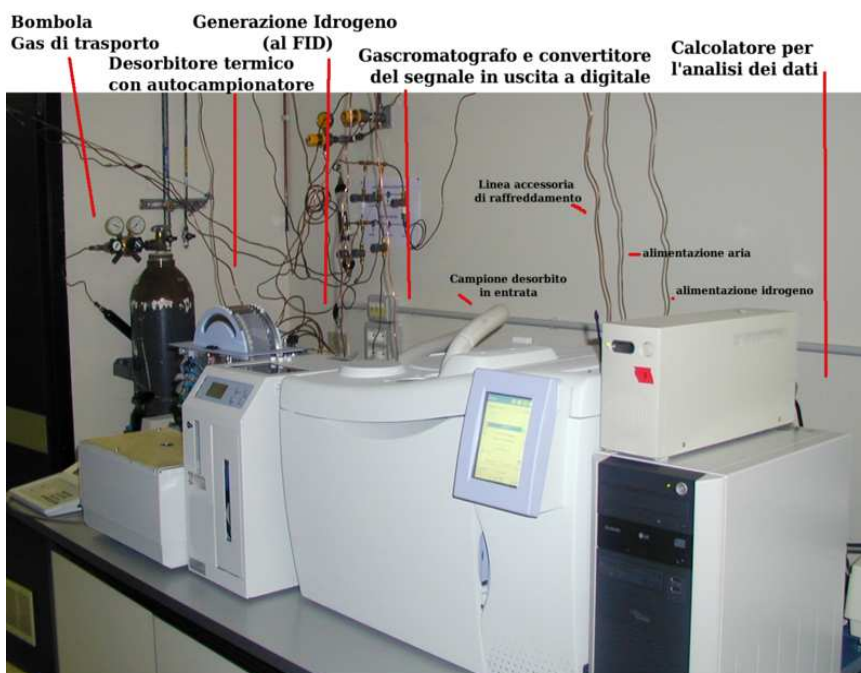


Fig.2. Strumento di gas-cromatografia

Dal cromatogramma è possibile ricavare: altezza, ampiezza ed area del picco e tempo di ritenzione. Dati, che permettono il calcolo di parametri quali selettività, efficienza e risoluzione della colonna.

Per l'analisi dei lipidi è necessario confrontare le aree dei picchi. Nella nostra analisi abbiamo utilizzato uno standard interno, l'acido nonadecanoico metil estere (C19:0); l'area del suo picco, nota la quantità di questo acido iniettata in colonna, è stata usata come riferimento per calcolare la quantità delle sostanze cui corrispondevano i picchi di interesse.

La spettroscopia di fluorescenza

Fin qui abbiamo descritto quelle procedure convenzionalmente adottate (e largamente impiegate in questo studio) per la determinazione dei lipidi totali presenti in un campione di cellule microbiche. Abbiamo già ricordato che si tratta di tecniche che consistono in molti steps successivi complicati e lunghi.

La spettroscopia di fluorescenza è una tecnica veloce a basso costo e rappresenta un'ottima alternativa ai processi classici cui vengono sottoposti i campioni per la determinazione dei lipidi in essi contenuti. La strategia convenzionale richiede l'estrazione dei lipidi dal campione e la loro derivatizzazione utile per la successiva analisi in gascromatografia. In aggiunta richiede necessari steps preparativi che portano inevitabilmente a perdite o a modificazioni di tipo chimico dei lipidi e non consentono né una quantificazione accurata né riproducibilità delle misure.

La preparazione del campione per una misura di fluorescenza è totalmente esente dai problemi sopra citati ed è di facile e veloce realizzazione, così come risulta molto più veloce una misura di luminescenza che non una gascromatografia.

Si è quindi cercato di sfruttare la tecnologia basata sulla spettroscopia di fluorescenza per ricavare indicazioni

qualitative e quantitative necessarie per classificare i lipidi prodotti dai lieviti. In particolare, si è pensato di utilizzare il Nile Red (9-dietilammino-5H-benzo[α]fenossazin-5-one), colorante benzofenossazonico di colore rosso altamente fluorescente in soluzioni organiche. Tale composto è già stato proposto qualche anno fa per determinare il contenuto lipidico di lieviti, alghe e ciliati (Cole TA *et al.*, 1990; Lee SJ, *et al.*, 1998) grazie al suo pronunciato solvatocromismo.

Parte di questo lavoro è stata focalizzata sullo studio e sull'ottimizzare di un metodo innovativo di analisi che fornisse attraverso veloci misure di fotoluminescenza la migliore caratterizzazione possibile del sistema biologico.

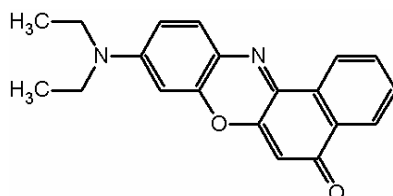


Fig.3. Formula di struttura del Nile Red.

Nile Red e sue proprietà fotofisiche

Il Nile Red (9-dietilammino-5H-benzo[α]fenossazin-5-one) è un colorante intensamente fluorescente ed esibisce proprietà uniche che lo rendono un candidato ideale per la determinazione istochimica dei lipidi. E' una molecola eterociclica neutra ed è solubile in solventi organici e in lipidi ma è anche relativamente solubile in acqua.

Si tratta di un composto che agisce da 'sonda idrofobica': la sua fluorescenza varia a seconda dell'idrofobicità relativa dell'intorno chimico che lo circonda. Per esempio quando viene sciolto in solventi idrocarburici, come in un mezzo di goccioline di lipidi neutri, quali i triacilgliceroli, dà una fluorescenza giallo-oro. Per contro, quando viene sciolto in solventi polari come etanolo o in vescicole di fosfolipidi per esempio la fosfatidilcolina, dà fluorescenza rossa. In mezzi

acquosi la fluorescenza del Nile Red è totalmente spenta. Sfruttando proprio questo suo spiccato solvatocromismo, è possibile utilizzare il Nile Red come colorante selettivo per la determinazione di goccioline di lipidi presenti nel citoplasma di cellule vive con citofluorimetria di flusso o microscopia di fluorescenza.

La possibilità di utilizzare il Nile Red in un mezzo acquoso fa sì che si possano evitare i solventi organici che potrebbero sciogliere i lipidi che si vogliono andare a studiare. Inoltre, come già detto, il colore della luce emessa è funzione del tipo di lipide con cui la sonda colorante interagisce; in altri termini si potrebbe potenzialmente riuscire a distinguere fra lipidi neutri e polari.

Lo spostamento del massimo di emissione di questo composto verso lunghezze d'onda maggiori aumenta all'aumentare della costante dielettrica del solvente in cui è sciolto, comportamento che si spiega con la natura polare dello stato eccitato del Nile Red, stabilizzato solo da solventi polari. Infine ricordiamo che le interazioni fra colorante e solvente sono principalmente legami a idrogeno.

Spettri di assorbimento

Lo spettrofotometro rende possibile l'acquisizione degli spettri di assorbimento elettronico.

I componenti dello spettrofotometro sono:

- ◇ sorgente (S): costituita da due lampade; una lampada al tungsteno che opera tra 900 nm e 320 nm ed una a deuterio che opera tra 320 nm e 190 nm,
- ◇ monocromatore (M): un reticolo di diffrazione,
- ◇ campione (C): soluzione contenente il campione da studiare contenuta in una cuvetta generalmente di quarzo,
- ◇ riferimento (rif): il solo solvente posto in una seconda cuvetta,
- ◇ rivelatore (R): un tubo fotomoltiplicatore,

- ◊ chopper (ch), un dispositivo meccanico che interrompe periodicamente il raggio di luce che esce dal campione e va verso il rivelatore,
- ◊ specchi (sp).

Il suo schema di funzionamento è illustrato in *figura 4*.

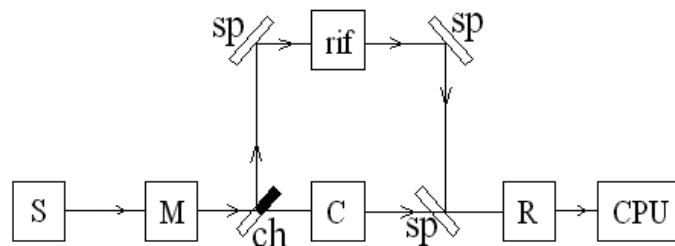


Fig.4. Schema a blocchi di uno spettrofotometro

Mediante questo strumento è possibile misurare l'assorbanza della soluzione contenente il campione da analizzare in funzione della lunghezza d'onda, ovvero, le transizioni elettroniche promosse dall'assorbimento della luce che portano la specie dallo stato elettronico fondamentale a stati elettronici eccitati. Lo strumento determina l'assorbanza del campione sottraendo alla misura, l'assorbanza del riferimento. Dagli spettri ottenuti è inoltre possibile risalire all'intensità della banda di assorbimento, espressa tramite il coefficiente di assorbività molare, ϵ , espresso in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, nella legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon cd$$

dove A è l'assorbanza del campione, d il cammino ottico della cuvetta (solitamente 1 cm) e c la concentrazione molare del campione.

Spettri di emissione e di eccitazione

Lo strumento che permette l'acquisizione degli spettri di emissione e di eccitazione si compone, schematicamente, di:

- ◊ sorgente (S): costituita da una lampada allo Xenon,

- ◇ due monocromatori: Mex in eccitazione e Mem in emissione,
- ◇ due fotomoltiplicatori: R1, per correggere il segnale in funzione dello spettro di emissione della lampada, e R2, per la rivelazione del segnale di emissione dell'analita,
- ◇ campione (C): soluzione contenente il campione da studiare contenuta in una cuvetta per spettrofluorimetro,
- ◇ chopper (ch),
- ◇ slitte: fenditure la cui apertura può essere modificata, determinando la banda passante.

Il suo schema di funzionamento è illustrato in *figura 5*.

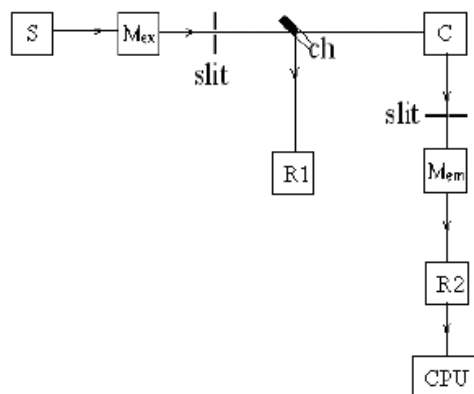


Fig.5. Schema a blocchi di uno spettrofluorimetro

Per registrare uno spettro di *emissione* si posiziona il monocromatore di eccitazione ad una determinata lunghezza d'onda, che normalmente coincide con il massimo di assorbimento, e si effettua una scansione di lunghezze d'onda con il monocromatore di emissione, registrando la variazione di intensità del segnale di luminescenza in funzione della lunghezza d'onda.

Per registrare uno spettro di *eccitazione* occorre fissare il monocromatore di emissione ad una data lunghezza d'onda in corrispondenza della banda di emissione del campione, in

generare il massimo di emissione o una lunghezza d'onda poco maggiore, mentre si fa eseguire al monocromatore di eccitazione una scansione di lunghezze d'onda alle quali il campione da studiare assorbe. Il segnale ottenuto è proporzionale, dopo le dovute correzioni, alla probabilità che il fotone assorbito di una determinata lunghezza d'onda popoli lo stato eccitato responsabile dell'emissione che si osserva registrando uno spettro appropriato.

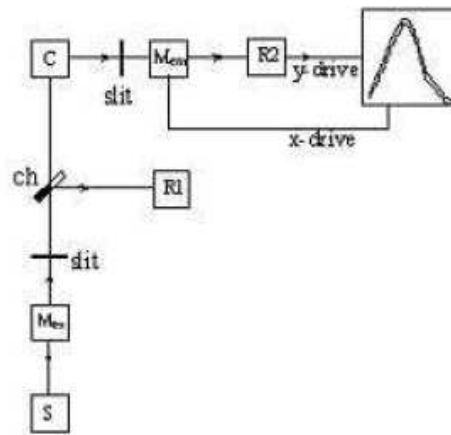


Fig.6. Viene schematizzato il funzionamento di uno spettrofluorimetro nel caso di registrazione di uno spettro di emissione.

Quando si lavora con campioni ad elevato scattering, altamente torbidi, o ad elevata assorbanza alla lunghezza d'onda di eccitazione è conveniente effettuare misure in front-face (FF) invece che misure classiche in right-angle (RA), in modo da ottenere misure più affidabili della luminescenza dei campioni da studiare. In quel caso la luce emessa dal campione viene raccolta ad un angolo minore di 90° , tipicamente fra 45° e 30° , configurazione che minimizza gli effetti di scattering e permette l'acquisizione di spettri di emissione più "puliti".

Rendimento quantico di emissione

Una grandezza molto usata in fotofisica è il rendimento quantico di emissione, o resa quantica di emissione.

E' definito come il rapporto fra il numero di fotoni emessi e il numero di fotoni assorbiti da una determinata specie

chimica nello stesso tempo e per una determinata lunghezza d'onda di eccitazione:

$$\Phi_e = n^\circ \text{ di fotoni emessi} / n^\circ \text{ di fotoni assorbiti}$$

La sostanza utilizzata come riferimento deve avere la stessa assorbanza del campione alla lunghezza d'onda di eccitazione e deve emettere nella stessa zona spettrale in cui emette il campione: in questo modo le aree sottese dalle curve di emissione ottenute sono misurate nelle stesse condizioni sperimentali. Sperimentalmente viene calcolato rispetto ad un composto di riferimento con Φ_e noto mediante l'equazione seguente:

$$\Phi_s = \Phi_r \cdot (A_r / A_s) \cdot (n_r^2 / n_s^2) \cdot (D_s / D_r)$$

dove Φ_s è il rendimento quantico del campione da determinare, Φ_r il rendimento quantico del riferimento, A_r l'assorbanza del riferimento alla lunghezza d'onda di eccitazione, A_s l'assorbanza del campione alla lunghezza d'onda di eccitazione, n_s l'indice di rifrazione del solvente in cui è sciolto il campione, n_r l'indice di rifrazione in cui è sciolto il riferimento, D_s l'area sottesa dalla curva di emissione del campione e D_r l'area sottesa dalla curva di emissione del riferimento.

Misure dei tempi di vita degli stati eccitati

Una proprietà fotofisica questa, che può essere utilizzata per distinguere un tipo di lipide da un altro poiché il tempo di vita dello stato eccitato del Nile Red, cambia a seconda dell'intorno chimico.

Le misure dei tempi di vita degli stati eccitati sono state effettuate utilizzando un dispositivo a fotone singolo, uno strumento in grado di misurare i tempi di vita degli stati luminescenti in un range compreso tra 0.5 ns e 30 μ s. La tecnica si basa sulla probabilità che un singolo fotone emesso

da un campione fluorescente venga captato da un opportuno rivelatore ad alta sensibilità.

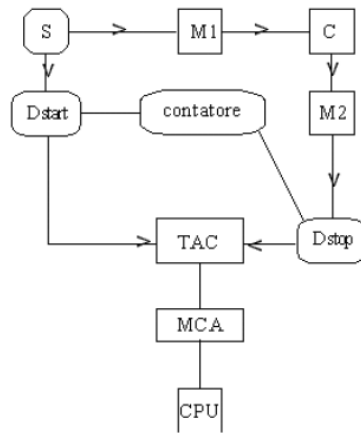


Fig.7. Schema a blocchi di un dispositivo a fotone singolo

Il funzionamento dello strumento si basa sui seguenti principi: se in seguito all'impulso di eccitazione emesso dalla lampada, il campione emette un fotone, il fotomoltiplicatore Dstat rileva il fotone emesso dal campione e manda un segnale (segnale di stop) al TAC, che, in pratica, funge da cronometro poiché misura l'intervallo di tempo trascorso tra il segnale di start, che corrisponde all'eccitazione del campione, e il segnale di stop, che corrisponde all'emissione di un fotone da parte del campione; tale intervallo di tempo è tramutato in un segnale elettrico inviato in seguito all'analizzatore multicanale MCA.

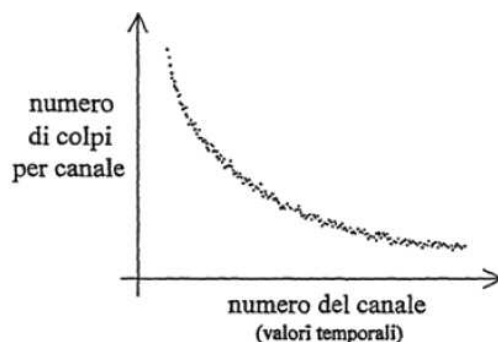


Fig.8. Esempio di un profilo di decadimento mono-esponenziale. I fitting mono- e bi- esponenziali sono stati ottenuti con un'analisi ai minimi quadrati e la loro attendibilità viene espressa dal fattore c_2 , che deve avere un valore di circa 1 affinché l'interpolazione sia attendibile.

I dati ottenuti dall'analizzatore multicanale vengono in seguito inviati al computer che ricostruisce il profilo di decadimento come quello riportato in *figura 8*.

Un decadimento monoesponenziale della curva intensità del segnale contro tempo è giustificato dalla relazione seguente:

$$I(t) = I_0 e^{(-t/\tau)}$$

dove I_0 è l'intensità dello stato eccitato al tempo 0 e τ è il tempo di vita dello stato eccitato, e viene utilizzata per stati eccitati che decadono con cinetiche del primo ordine. Esistono casi più complessi in cui si osservano decadimenti multiesponenziali o non esponenziali.

Va infine tenuto conto che il tempo di vita di uno stato eccitato dipende dalla temperatura, essendo una grandezza di derivazione cinetica.

Anisotropia di fluorescenza

Le misure di anisotropia di emissione sono utili strumenti per verificare se il colorante si è intercalato o meno in una qualche parte della micella. Valori di anisotropia differenti da zero supportano l'ipotesi che il Nile Red si intercali negli strati micellari e che quindi possa essere efficacemente utilizzato come "probe lipidico".

Le misure di anisotropia di fluorescenza sono principalmente utilizzate per studiare la dinamica di rotazione di un fluoroforo nello spazio ed il trasferimento di energia di eccitazione. La velocità e la libertà di rotazione sono condizionate da fattori propri del sistema fluorescente, come la sua massa e la sua struttura, e da altri legati alle proprietà del mezzo. Per questo l'anisotropia di fluorescenza è tradizionalmente utilizzata per studiare processi che comportino variazioni configurazionali o strutturali, ma anche per misurare la mobilità di una specifica sonda all'interno di una membrana ed in particolare in sistemi supramolecolari.

L'anisotropia di fluorescenza è una grandezza che permette di quantificare la polarizzazione della fluorescenza proveniente da un campione eccitato con luce polarizzata.

Le misure di polarizzazione sono eseguite inserendo due polarizzatori: uno nel percorso ottico di eccitazione e uno in quello di emissione *figura 9*.

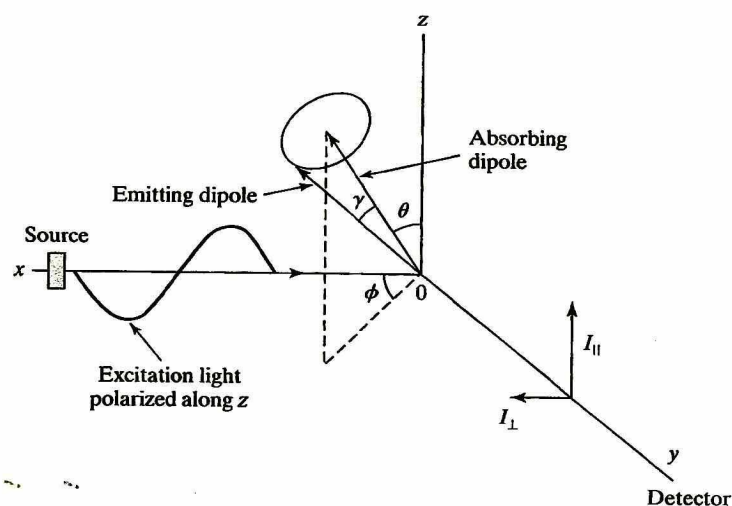


Fig.9. Funzionamento schematico dello strumento che misura in anisotropia di fluorescenza

Si misurano le intensità di fluorescenza con il polarizzatore di emissione orientato parallelamente (I_{\parallel}) e perpendicolarmente (I_{\perp}) al polarizzatore di eccitazione, e viene valutato il grado di polarizzazione, P.

$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$$

Spesso però è più conveniente usare un'altra relazione, l'anisotropia, r, indicata di frequente anche A.

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$$

dove il valore di $(I_{\perp} + 2I_{\parallel})$ è proporzionale alla intensità emessa totale, indipendentemente dalla direzione di raccolta, cioè alla somma della componente parallela alla polarizzazione di incidenza e delle due componenti perpendicolari ad essa.

L'origine dell'anisotropia di fluorescenza è legata alla polarizzazione delle transizioni elettroniche nelle molecole: ad ogni transizione è associato un vettore chiamato momento di transizione, che possiede una determinata orientazione rispetto alla struttura della molecola. In generale quando la disattivazione di uno stato eccitato avviene per via radiativa, il fotone emesso risulta essere polarizzato parallelamente al momento di transizione: se quindi si osserva una sola molecola, la polarizzazione della luce emessa è parallela alla direzione individuata dalla transizione responsabile della fluorescenza.

In generale però le misure vengono effettuate su un grande numero di molecole simultaneamente, e per di più queste molecole sono orientate in modo del tutto casuale e sono libere di ruotare se sono in soluzione. Nonostante ciò, se l'eccitazione viene effettuata con luce polarizzata è possibile ottenere emissione di luce polarizzata. Questo avviene poiché in tal modo si effettua una *eccitazione selettiva* del campione sulla base dell'orientazione dei momenti di transizione, questo fenomeno è detto *fotoselezione*. La probabilità di eccitare ogni singola molecola dipende dall'orientazione del momento di transizione rispetto al piano di polarizzazione della luce di eccitazione: nel caso di luce non polarizzata tutte le molecole si trovano nella stessa situazione. La probabilità di eccitare una singola molecola è massima quando il piano di polarizzazione della luce di eccitazione è parallelo al momento di transizione ed è minimo quando è ad esso perpendicolare. Utilizzando luce polarizzata, verranno eccitati prevalentemente quelli orientati in modo tale che il momento di transizione risulti parallelo al piano di polarizzazione della luce di eccitazione. L'emissione di

luce a seguito dell'eccitazione avverrà pure in modo polarizzato secondo la direzione individuata dai momenti di transizione.

Se si utilizza luce non polarizzata, non osserviamo alcuna polarizzazione macroscopica, poiché l'emissione complessiva è la somma di transizioni orientate in modo casuale.

Una misura di anisotropia di fluorescenza su molecole immobilizzate, ad esempio congelando la soluzione, permette di calcolare l'angolo compreso fra il momento di transizione associato ad una qualunque transizione in assorbimento e quello relativo alla transizione responsabile dell'emissione. Precisamente, se θ è l'angolo tra il piano di polarizzazione della luce incidente e il momento di dipolo della transizione di una particolare molecola, la probabilità di assorbimento è proporzionale a $\cos^2 \theta$.

Al contrario, se possono aversi molte collisioni e rotazioni molecolari disordinate prima dell'emissione, l'orientazione ordinata delle molecole eccitate sarà persa e l'emissione osservata non sarà polarizzata. Il fenomeno viene detto depolarizzazione della fluorescenza.

Perciò misure di polarizzazione della fluorescenza (o di anisotropia della fluorescenza) possono fornire informazioni sulle *velocità dei moti molecolari*. Infatti i tempi di vita caratteristici della fluorescenza sono dell'ordine di grandezza dei moti di rotazione delle molecole biologiche tipiche in soluzione acquosa a temperatura ambiente, per cui le misure sulla perdita di polarizzazione (depolarizzazione) della radiazione emessa sono particolarmente utili nello studio della *dinamica molecolare*.

Scopo della tesi

Il crescente interesse verso gli acidi grassi polinsaturi appoggiato dal recente significato che hanno acquisito in materia di salute e prevenzione di malattie, insieme alla difficoltà nel reperirli, hanno dato impulso ad una serie di ricerche concentrate sul bisogno di trovare fonti adeguate di tali sostanze, in particolare di quelle presenti quasi esclusivamente nei pesci (acido eicosapentaenoico e docosaesanoico).

Osservatori mondiali dello stato di salute della società come l'AHA (*American Health Association*), per esempio, hanno già da alcuni anni raccomandato di aumentare l'apporto dietetico di n-3 PUFA anche negli individui sani. In risposta, n-3 PUFA sono stati incorporati in fonti di cibo tradizionali e non. La composizione in acidi grassi di oli tradizionali (ad esempio, soia e colza) è stata geneticamente modificata proprio per offrire fonti più concentrate in n-3 PUFA, tuttavia, la vera alternativa si è avuta solo con l'avvento delle alghe, una delle poche fonti terrestri di acido docosaesaenoico (DHA) in forma concentrata.

I PUFA di maggior valore nutrizionale, verso i quali è diretto l'interesse dell'industria alimentare e farmaceutica, sono l'acido γ -linoleico (GLA, C18:3n-6) e l'acido arachidonico (ARA, C20:4n-6) fra gli omega-6; l'acido eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3) e l'acido docosaesaenoico (DHA, C22:6n-3) fra gli omega-3. La produzione di lipidi con un processo fermentativo che utilizzi microorganismi oleaginosi appare, tuttavia, promettente anche per quelle applicazioni industriali legate al settore della bioenergia.

Differenze sul profilo degli acidi grassi sono state già opportunamente documentate nei lieviti che crescono a diverse temperature (Arthur H *et al.*, 1976; Mc Murrough I *et al.*, 1973; Watson K, 1978; Watson K *et al.*, 1976; Watson K *et al.*, 1978),

ciò nonostante, non è ancora stato fatto uno studio comparativo rigoroso sui comportamenti fisiologici di lieviti psicrofili obbligati, facoltativi e mesofili. Il presente studio ha pertanto voluto anzitutto colmare tale lacuna, confrontando sia i parametri di crescita che la composizione lipidica di 26 ceppi di lieviti, rappresentanti di 12 specie, raggruppate sulla base dei limiti di temperatura in psicrofili obbligati, facoltativi e mesofili.

Consapevoli che i microrganismi adattatisi a vivere in ambienti permanentemente freddi rappresentano una fonte inesplorata di biodiversità potenzialmente applicativa, questo studio ha voluto riconoscere, proprio fra quelli, nuove specie da potere impiegare come SCO, per sviluppare processi competitivi di produzione di oli microbici. L'idea di individuare specie oleaginose fra quelle adattate a vivere in habitats con valori di temperature prossime allo zero era verosimile, essendo noto il ruolo essenziale che acidi grassi altamente polinsaturi, immagazzinati nei fosfolipidi di membrana, avrebbero nel mantenimento delle funzionalità di membrana in ambienti permanentemente freddi.

I tre gruppi di lieviti sono stati coltivati in un terreno avente un rapporto C:N ottimizzato a favore del primo, a diverse temperature, per capire se i parametri di sviluppo, l'accumulo dei lipidi, la composizione in acidi grassi, il loro grado di insaturazione potevano dirsi risposte di acclimatazione o di adattamento. Era nostra intenzione capire quali forme di adattamento metabolico appoggiano la capacità di microrganismi psicrofili a sopravvivere in ambienti glaciali, che è frutto di una specializzazione fisiologica poco indagata e, inoltre, se potevano essere in relazione con l'efficienza della sintesi dei PUFA.

D'altro canto, l'efficienza del processo microbico di sintesi è un parametro da non trascurare, essendo chiaro da indagini economiche che solo una produzione microbica con alti coefficienti di resa negli acidi grassi di interesse può

realmente competere con la quantità di oli prodotti dai semi delle piante, normalmente utilizzati in ambito industriale. Per meglio evidenziare le eventuali potenzialità applicative dei lieviti psicrofili, sarebbe stato utile approfondire la conoscenza di un microrganismo marino eterotrofo, *Schizochytrium limacinum* SR21, notoriamente capace di accumulare alte percentuali di lipidi nella sua massa microbica (quasi mai inferiore al 20% in peso). Si tratta di uno dei pochi microrganismi attualmente già impiegato per la produzione industriale di DHA attraverso un processo di fermentazione.

Poiché parte importante delle nostre analisi sarebbe stata, infine, la quantificazione continua, a diversi tempi di fermentazione del contenuto lipidico intracellulare di più colture anche avviate contemporaneamente, l'aspetto più limitante del lavoro sarebbe stato la determinazione di quel contenuto con metodo classico (*Folch*), i cui numerosi steps preparativi non garantiscono la quantificazione accurata e la riproducibilità delle misure. Quindi, era necessario provare a mettere a punto un metodo più semplice e rapido per la determinazione quali-quantitativa dei lipidi intracellulari, che caratterizzasse al meglio il nostro sistema e che poteva essere utile anche per ulteriori studi come il monitoraggio di composti o di mutanti che possono influenzare la formazione dei corpi lipidici. Il metodo di analisi ottimale doveva risultare facile, veloce e a basso costo; tutte qualità di una misura di spettroscopia di fluorescenza.

In conclusione, si può dire che questo studio è stato iniziato con l'obiettivo di contribuire ad aumentare le conoscenze sulla natura dei meccanismi metabolici che regolano l'accumulo dei lipidi nelle cellule di lievito, nonché delle risposte fisiologiche che permettono ai lieviti psicrofili prima di adattarsi, quindi di riuscire a vivere in ecosistemi permanentemente freddi. Riuscire, nel frattempo, anche a verificare buone rese in prodotto lipidico di interesse,

rappresenterebbe un valore aggiunto per questa ricerca da cui partire per applicazioni biotecnologiche interessanti ed innovative.

Materiali e metodi

Ceppi e condizioni di coltura

I ceppi di lieviti psicrofili obbligati (o psicrotrofi) e psicrofili facoltativi (o psicrotolleranti), impiegati in questo studio provengono dalla collezione di lieviti del Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università di Perugia (DBVPG) (www.agr.unipg.it/dbvpg), dalla collezione americana ATCC (American Type Culture Collection), oppure dalle collezioni del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Bologna.

I 20 ceppi di lieviti psicrofili sono stati isolati da campioni di ghiaccio, sedimenti e acque di fusione provenienti da due ghiacciai alpini italiani (Turchetti et al., 2008). Questi appartengono alle specie *Cryptococcus gilvescens*, *Rhodotorula creatinivora*, *Rhodotorula laryngis*, *Rhodotorula glacialis*, e alla specie yeast-like *Aureobasidium pullulans*; l'identificazione dei ceppi riconosciuti come *Leucosporidium* spp. and *Mrakia* spp. è tuttora in corso.

I 6 ceppi di lieviti mesofili, appartengono alle diverse specie di *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia farinosa* e finalmente *Zygosaccharomyces rouxii*.

Per meglio comprendere l'efficienza della sintesi degli acidi grassi polinsaturi da lieviti, la ricerca è stata ampliata inserendo un microrganismo già commercialmente utilizzato per produrre PUFA. Si tratta del microfungo marino eterotrofo *Schyzochitrium limacinum* SR21 che appartiene alla famiglia delle Thraustochytriidae, ordine Labirinthulida, di proprietà della American Type Culture Collection (Honda D et al., 1998).

Ceppo	Sigla DBVPG
Psicrofili obbligati	
<i>Leucosporidium</i> sp.	4753
<i>Leucosporidium</i> sp.	4799
<i>Rhodotorula creatinovora</i>	4794
<i>Mrakia</i> sp.	4775
<i>Mrakia</i> sp.	4756
<i>Mrakia</i> sp.	4757
<i>Mrakia</i> sp.	4761
<i>Mrakia</i> sp.	4754
<i>Mrakia</i> sp.	4801
<i>Rhodotorula glacialis</i>	4806
<i>Rhodotorula glacialis</i>	4785
<i>Rhodotorula glacialis</i>	4786
<i>Rhodotorula glacialis</i>	4716
Psicrofili facoltativi	
<i>Rhodotorula laryngis</i>	4765
<i>Rhodotorula laryngis</i>	4772
<i>Aureobasidium pullulans</i>	4778
<i>Cryptococcus gilvescens</i>	4714
<i>Cryptococcus gilvescens</i>	4720
<i>Cryptococcus gilvescens</i>	4803
<i>Cryptococcus gilvescens</i>	4722

Tab. 1. Elenco dei ceppi di lieviti psicrofili obbligati e facoltativi utilizzati nello studio.

Ceppo	Sigla DBVPG
<i>Saccharomyces boulardii</i>	codex
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L19
<i>Saccharomyces exiguus</i>	L10
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	L3
<i>Pichia farinosa</i>	L9
<i>Zigosaccharomyces rouxii</i>	L20

Tab. 2. Elenco dei ceppi di lieviti mesofili utilizzati nello studio.

Per questo studio è stato messo a punto un terreno di coltura specifico, ossia, un medium complesso GMY che diversamente dai terreni normalmente impiegati per coltivare lieviti, vanta un eccesso di fonte di carbonio a fronte di una carenza, opportuna, di fonte azotata.

Tutti i ceppi di lievito inseriti nella ricerca sono stati prima isolati quindi mantenuti su piastre (*figura 1*) e becchi di clarino di terreno complesso GMY agarizzato (18% w/v), incubati e conservati a 4°C.

Il terreno complesso GMY è così definito: contiene 40 g/L di glucosio quale fonte di carbonio, 3 g/L di estratto di lievito (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) quale unica fonte di azoto, 8 g/L di KH_2PO_4 e 0.5 g/L di $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Buzzini P., 2001); un pH finale corretto a 5.5. Salvo diversa indicazione, tutti i prodotti sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania).

I soluti del terreno GMY hanno la seguente composizione percentuale (w/w): 0.79% N, 32.05% C, 9.49% H, che corrisponde ad un rapporto C:N (w/w) di 40.6:1.

Per poter rendere valida la clusterizzazione iniziale dei ceppi di lievito in studio fatta sulla base dei diversi limiti di temperatura tollerati, sono state osservate le cinetiche di crescita di ciascun microrganismo in terreno complesso GMY a diverse concentrazioni di glucosio e alle diverse temperature. Le prove sono state condotte in modalità batch in beute agitate mediante un agitatore orbitale refrigerato e non (150 rpm).

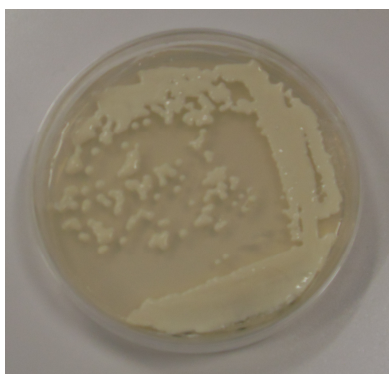


Fig.1. Esempio di colonie di lievito psicrofilo (*Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785) su terreno agarizzato GMY.

Il microfungo *Schyzochitrium limacinum* SR-21 è stato coltivato inizialmente in un terreno ben definito (YPD in sea water), ottenuto usando esclusivamente acqua di mare e che si compone dei seguenti ingredienti: estratto di lievito, 1 g/L; peptone 1 g/L e D (+) glucosio 5 g/L. pH ottimale: 7.

Il microrganismo è stato preservato effettuando trapianti mensili in terreno fresco agarizzato.

Prove di crescita in beuta, scale up in fermentatore e parametri monitorati

I ceppi di lievito psicrofili obbligati e facoltativi sono stati coltivati alle due temperature di 4 e 18°C per 14 giorni, tempo in cui viene conseguita la fase stazionaria di crescita. Le beute sono state inoculate, come di consueto (10% vol/vol), a partire da preinoculi in fase esponenziale di crescita coltivati alla temperatura di 4 e 18°C.

I lieviti mesofili sono stati coltivati alle due temperature di 18 e di 30°C, per 14 e per 5 giorni, rispettivamente; le beute, in questo caso, sono state inoculate (10% vol/vol) a partire da pre-colture di 5 giorni e sviluppate alla temperatura ottimale di 30°C.

Le cinetiche di crescita sono state seguite lavorando su beute da 500 ml di volume riempite con 50 ml di terreno complesso GMY. I preinoculi invece sono stati preparati in beute da 100 ml riempite con 10 ml dello stesso terreno complesso.

Per le prove effettuate in bioreattore, dai ceppi in esame sono state ottenute preventivamente delle precolture impiegate per inoculare beute da 1 L con frangionda riempite con 150 ml dello stesso terreno. Le colture sono state sempre mantenute per tutto il tempo della prova alle temperature desiderate e in agitazione costante.

Periodicamente, dalle colture in beuta o ugualmente da quelle avviate in fermentatore, campioni di brodo colturale venivano prelevati, per monitorare la crescita dei ceppi attraverso i seguenti parametri:

- torbidità del brodo colturale tramite misure spettrofotometriche alla lunghezza d'onda di 600 nm (OD_{600});
- numero di cellule mediante camera di Burker e conta della vitalità cellulare su piastra;
- peso secco della biomassa sviluppata, misurata gravimetricamente;
- quantità di glucosio rimanente nel mezzo di coltura tramite HPLC;

- composizione lipidica mediante metodo *Folch* e successiva analisi gascromatografica.

Tutte le misure sono state effettuate dopo 14 giorni, per le colture cresciute a 4 e a 18°C, dopo 5 giorni, per quelle cresciute a 30°C.

Le velocità specifiche di sviluppo massime sono state calcolate durante la fase di crescita esponenziale, che graficamente corrisponde alla pendenza del tratto rettilineo della curva di crescita su scala semilogaritmica, mediante la seguente formula:

$$\mu_{\max} = \ln(X_2 - X_1) / (t_2 - t_1)$$

in cui X_2 e X_1 sono i valori di OD₆₀₀ ai tempi t_2 e t_1 .

Colture del ceppo di psicrofilo obbligato *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 in beute agitate contenenti 4 o 40 g/L di glucosio sono state avviate per valutare gli effetti della diversa disponibilità di glucosio sulla cinetica di sviluppo del ceppo e sulle rese in prodotto lipidico.

Colture batch in bioreattore

Le prove di fermentazione condotte in modalità batch sul ceppo selezionato dallo screening iniziale *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785, sono state condotte in un bioreattore Sixfors V3.01 (INFORS, Svizzera) (figura 2).

Il bioreattore è dotato di sei vessel ciascuno con una capacità massima di 500 mL ed equipaggiati di 2 turbine Rushton da 30 mm, pari alla metà del diametro interno del vessel e di uno sparger toroidale da 40 mm posto a 15 mm dal fondo. È dotato inoltre di un software (Iris V5 IRIS Software, Infors) on-line che provvede al controllo, alla regolazione e alla registrazione di diversi parametri durante l'analisi fermentativa: agitazione, temperatura, pH, ossigeno disciolto, potenziale redox, flusso di gas, livello di schiuma e feeding.

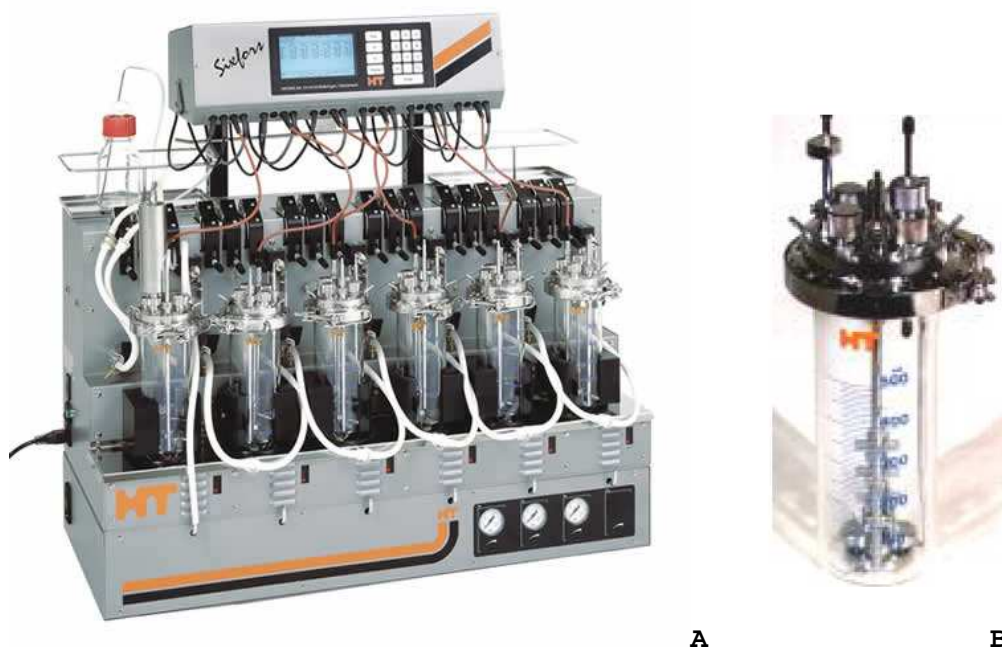


Fig.2. Fermentatore Sixfors (A); vessel Sixfors (B)

Il bioreattore è dotato anche di un pH-metro e di pompe peristaltiche per l'aggiunta automatica all'occorrenza di base, acido e antischiama.

Le colture batch sono state condotte in un volume di terreno GMY di 400 ml.

I vessel riempiti del terreno privo della fonte di carbonio sono stati addizionati di 0.1 ml di antischiama (polipropilenglicole) e sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per 30 minuti. Per evitare eventuali reazioni di Maillard, la fonte di carbonio è stata sterilizzata separatamente ed aggiunta successivamente al terreno sterile.

Al momento dell'inoculo il bioreattore è stato inoculato con 40 ml (10% v/v) di una coltura del lievito in esame in fase esponenziale, cresciuta in beuta nel medesimo terreno alla temperatura di studio.

Tutte le colture batch sono state mantenute ad un'agitazione di 800 rpm ed un'aerazione di 0.2 l/min a pressione atmosferica per garantire una condizione costante di aerobiosi. Non è stata utilizzata nessuna regolazione automatica del pH né della schiuma. Quando il sistema è stato

utilizzato per l'analisi simultanea di più colture, ogni vessel aveva un suo valore impostato di temperatura e di questi sono state nello stesso tempo determinate le cinetiche di sviluppo e le concentrazioni lipidiche.

Focalizzando l'argomento sul solo ceppo di lievito psicrofilo *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785, le temperature scelte per lo studio in bioreattore sono state, -3, 0, 5, 10, 15, 20 e 25°C. La temperatura è stata mantenuta costante per tutta la durata della fermentazione; i fermentatori sono stati portati al di sotto della temperatura ambiente mediante glicole etilenico raffreddato in termocriostato e immesso nel circuito idraulico di termostatazione dei bioreattori. Per evitare che il brodo di coltura potesse congelare quando la temperatura era di -3°C, è stato utilizzato NaCl 30g/L. La crescita del lievito in bioreattore è stata seguita monitorando a tempi prestabiliti e come di consueto, la torbidità, il peso secco e la concentrazione di glucosio residuo. Quando la fase stazionaria era conseguita, la biomassa veniva raccolta e destinata alle analisi sulla composizione lipidica delle cellule.

Per *Schyzochitrium limacinum* SR-21 sono state ripetute fermentazioni in terreni YPD in acqua di mare con diverse disponibilità di carboidrato. Il terreno povero in carboidrato aveva un contenuto di 6 g/L di D(+) glucosio che diventava pari a 60 g/L nel terreno ricco in fonte di carbonio (tabella 3). Le condizioni di agitazione ed aerazione (200 rpm, 0,6 Nl/min) erano le stesse. Il volume di fermentazione era di 500 ml, con un inoculo iniziale al 10% (v/v). Durante il processo è stato costantemente monitorato l'andamento del pH. Per quanto riguarda il controllo di tutti gli altri parametri del processo questo è stato effettuato usando gli stessi metodi e gli stessi criteri delle fermentazioni compiute sui lieviti.

Prove di fermentazione su <i>Schizochytrium limacinum</i> SR21		
	Terreno povero	Terreno ricco
Glucosio	6 g/l	60 g/l
Peptone	1 g/l	10 g/l
Yeast Extract	1 g/l	10 g/l
Temperatura	25°C	25°C
pH iniziale	7	7
Agitazione	200 rpm	0,6 Nl/min
Aerazione	200 rpm	0,6 Nl/min

Tab.3. Condizioni di coltura per le fermentazioni di *S. limacinum* SR21.

Metodiche analitiche adoperate

Misurazione della massa cellulare: torbidità e peso secco

Dopo ogni inoculo in terreno fresco è stato valutato lo sviluppo della massa microbica in coltura prelevando ad intervalli di tempo definiti piccole aliquote di brodo trattate per effettuare misure di assorbanza e di peso secco. Assorbanza. L'aumento dell'assorbanza a 600 nm (A600) è stato valutato utilizzando uno spettrofotometro Beckman DU® 530, Life Science UV/VIS.

Peso secco. Per misurare l'aumento del peso secco sono stati prelevati, direttamente dai bioreattori oppure dalle beute rispettivamente 10 ml o 2 ml di coltura che venivano filtrati su una membrana di nitrocellulosa precedentemente pesata (porosità di 0.45 µm). La biomassa veniva lavata con acqua distillata sterile e la membrana posta ad essiccare per 24 ore a 105°C, ricavandone poi la biomassa netta.

Misurazione del numero di cellule: conta microscopica e conteggio vitale su piastra

Conta microscopica. Il metodo utilizza un particolare vetrino tarato detto camera Burker utile per il conteggio al microscopio dei microrganismi. Una piccola quantità di sospensione cellulare è stata trasferita sul vetrino, con il coprioggetto montato, permettendo il riempimento della camera per capillarità. Ciascun quadrato della camera Burker, con il coprioggetto in posizione, ha un volume di 0.1 mm³ o di 10⁻⁴

cm³. Essendo 1 cm³ equivalente a 1 ml la concentrazione di cellule per ml sarà determinata con il seguente calcolo:

Cellule per ml = conteggio medio di cellule per quadrato x fattore di diluizione x 10⁴

Conteggio vitale in piastra. Il metodo è alquanto preciso ed implica l'impiego di piastre petri contenenti l'opportuno terreno GMY o YPD agarizzato. Al conseguimento della fase stazionaria di crescita sono state contate le unità formanti colonie (CFU) dei lieviti oppure del microorganismo marino inoculando le piastre con campioni diluiti del brodo colturale in modo da ottenere colonie separate del microorganismo in esame.

Analisi del glucosio con HPLC

Per determinare il glucosio residuo in coltura, 1 ml di brodo veniva centrifugato (10.000 rpm per 10 minuti) e il surnatante utilizzato direttamente per l'iniezione in HPLC. Per questo fine è stata impiegata una colonna capillare Aminex HPX-87H ad esclusione ionica a temperatura ambiente. L'iniezione è stata effettuata mediante un auto campionatore che misura un volume di iniezione di 10 µl esatti, garantendo così l'alta riproducibilità dei volumi iniettati. L'analisi è stata condotta con eluizione isocratica, utilizzando come eluente acido solforico 0.01 N, preparato con acqua deionizzata filtrata impiegando filtri da 0.45 µm (Millipore), e velocità di flusso 0.6 ml/min. L'assegnazione dei picchi è stata effettuata sulla base del tempo di ritenzione del glucosio: RT = 8.9. La quantificazione delle sostanze è stata eseguita mediante integrazione dell'area sottesa ai picchi. A tal fine è stato necessario il riferimento ad una retta di taratura (R² ± 0.999):

Analita	Equazione retta di regressione
glucosio	$y = 20848 + 139020x$

costruita utilizzando le seguenti concentrazioni di standard 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 e 40.0 g/L.

La rivelazione della fonte di carbonio è stata effettuata da un detector ad indice di rifrazione (RID, *refractive index detector*). Il rivelatore ha il compito di misurare la differenza dell'indice di rifrazione tra la cella contenente il campione e la cella di riferimento che contiene solo l'eluente. Per l'analisi viene utilizzato un fascio di luce collimato e filtrato che permette di rimuovere la luce IR che riscalderebbe il campione. Una volta che l'eluente contenente l'analita è entrato nella cella di misura, il fascio di luce viene deflesso ed inviato ad un fotodiodo che produce un segnale in uscita diverso da quello prodotto dal solo eluente, generando un picco sul cromatogramma. Questo rivelatore ha il vantaggio di non risentire delle variazioni di flusso in entrata, sebbene abbia una prestazione fortemente condizionata dalla temperatura in uso e richiede, pertanto, di essere termostato con cura.

Colorazione dei lipidi intracellulari ed osservazione al microscopio

Per valutare la quantità di "olio" accumulato nelle cellule microbiche è stato utilizzato un colorante lipofilo, il *Sudan Black B*. Nelle cellule colorate dei microorganismi che contengono inclusioni citoplasmatiche lipidiche, sono ben visibili al microscopio ottico granuli intracitoplasmatici di colore blu scuro che non sarebbero altrimenti visibili se i granuli fossero assenti (Thakur M.S., Prapulla S.G. e Karanth N.G., 1989). Prima dell'osservazione microscopica, le cellule sono state fissate alla fiamma su un apposito vetrino e ricoperte con una soluzione 3 g/L di Sudan Black B (Sigma Aldrich) in etanolo 70%. Dopo 10 min il vetrino è stato lavato con acqua, lasciato asciugare ed osservato al microscopio con obiettivo ad immersione 100X a luce diretta quindi eventualmente fotografato.

Estrazione ed analisi dei lipidi mediante GC/MS

L'analisi dei lipidi si compone di tre fasi fondamentali:

- ✓ estrazione
- ✓ idrolisi e derivatizzazione
- ✓ analisi dei lipidi mediante impiego di un gas-cromatografo

La biomassa delle colture arrivate in fase stazionaria è stata raccolta per centrifugazione (3000 x g, 5 min, 0°C), lavata con acqua distillata sterile ed infine stored a -80°C per essere poi sottoposta a liofilizzazione (Lyolab 3000, Heto-Holten, Allerød, Denmark).

I lipidi sono stati estratti seguendo il *metodo Folch et al.* (1957) dopo avervi apportato alcune modifiche. 50 ml di una miscela cloroformio/metanolo (2:1 v/v) sono stati aggiunti per ogni grammo di biomassa liofilizzata che, dopo l'aggiunta, è stata lasciata in agitazione orbitale per 16 ore. L'estratto ottenuto è stato filtrato in una colonna con celite e anidrificante di Na₂SO₄ rimuovendo in questo modo i detriti cellulari e l'acqua mentre il solvente è stato rimosso con Rotovapor. La frazione lipidica ricavata è stata pesata e raccolta. Il parametro di resa lipidi/biomassa ($Y_{L/X}$), calcolato a questo punto, misura i gr di lipidi estratti per gr di biomassa secca.

Il profilo degli acidi grassi presenti nell'estratto lipidico è stato determinato effettuando un'analisi mediante GC/MS dopo aver opportunamente trasformato gli acidi grassi nei rispettivi metilesteri in accordo con il *metodo Morrison e Smith* (1964). Nel particolare, l'estratto lipidico viene dissolto in 2 ml di una miscela 1:1 di esano e BF₃ (14% in metanolo, Sigma-Aldrich) e trasferito in tubi Schlenk. 5 mg di gliceriltriundecanoato vengono aggiunti al fine di generare lo standard interno per l'analisi gascromatografica. La reazione è condotta in un bagno d'olio termostato a 100°C per 1 h. Conclusa la reazione, 2 ml d'acqua bidistillata sono aggiunti per neutralizzare il BF₃.

Recuperata la fase organica viene trasferita in un vial ed infine iniettata nello strumento di cromatografia.

Il gas cromatografo impiegato in questo lavoro è lo strumento tecnico a scopo analitico Hewlett Packard 5890 Series II che basa la sua capacità di indagine sfruttando l'equilibrio di ripartizione di diverse sostanze tra una fase liquida stazionaria ed una fase gassosa mobile. Il campione, posto in testa alla colonna, è sottoposto al flusso costante del gas di trasporto, l'elio, e viene separato nelle sue componenti in funzione di quanto esse sono affini (di solito per polarità) alla fase fissa.

La colonna utilizzata è una HP-5 M.S. (Agilent Technologies, diametro interno 0,20 mm, spessore del film 0,5 μm , lunghezza 30 m), accoppiata ad uno spettrometro di massa a quadrupolo (HP5972 mass selective detector) in modalità EI ionization (energia di ionizzazione 70 eV). L'iniezione è stata effettuata a 280°C, lungo la colonna è stato applicato un gradiente termico da 80° a 130°C, con un incremento di 50°C/min, poi da 130 a 280°C, con un aumento di 5°C/min e 20 minuti finali di isoterma. Come fase mobile è stato utilizzato elio con purezza del 99.999 % ed è stata mantenuta, durante le analisi, una pressione di testa costante di 9 psi.

Dal confronto del pattern di frammentazione di ogni picco ottenuto con la banca dati NIST05 è stato possibile caratterizzare la composizione in acidi grassi dei campioni esaminati. Grazie all'aggiunta dello standard interno (triundecanoina) è stato possibile inoltre ottenere una determinazione quantitativa dei grassi estratti riportando le aree dei picchi.

Per facilitare il confronto delle composizioni lipidiche risultate da ogni campione di lievito testato, a ciascuno di questi è stato assegnato dopo averlo opportunamente calcolato, un indice di insaturazione (UI, *unsaturation index*), parametro che rappresenta il numero di doppi legami presenti su ogni

catena di acido grasso moltiplicato per la sua quantità relativa e si esprime come di seguito:

$$UI = \frac{1 \times \Delta 1 + 2 \times \Delta 2 + 3 \times \Delta 3}{\text{total fatty acids}}$$

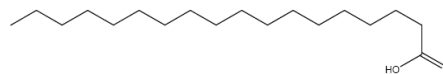
Misure di spettroscopia di fluorescenza

Le prove effettuate in spettroscopia di fluorescenza hanno richiesto i seguenti composti: Nile Red (C₂₀H₁₈N₂O₂, Fluka, standard Fluka, 100 mg, PM 318.37, F 8-10), acetone (Uvasol), PBS (Phosphate Buffer Solution 10 mM, 0.15 M KCl, pH = 7), acetonitrile (Uvasol), SDS (Sodio Dodecil Solfato).

Fra l'enorme quantità di coloranti organici è stato utilizzato il Nile Red poiché risponde a requisiti precisi per la rivelazione dei lipidi: mostra forte colorazione e fluorescenza in presenza di oli, alta solubilità in queste sostanze e incapacità di interagire con qualsiasi altra costituente tissutale che non sia già in soluzione. Si tratta inoltre di un colorante che si mostra idoneo ad essere utilizzato nell'ambiente acquoso delle cellule poiché si dissolve preferenzialmente nei lipidi. Il Nile Red possiede altre due caratteristiche particolarmente vantaggiose: la sua fluorescenza viene spenta in ambiente acquoso e quindi dà fluorescenza solo in presenza delle sostanze che si intende colorare, infine, il colore della luce emessa varia a seconda dell'idrofobicità del proprio intorno.

I seguenti standard lipidici sono stati scelti per verificare la relazione fra intensità del segnale fotoluminescente e concentrazione di lipide, la capacità del segnale di discriminare il lipide in funzione della sua polarità, la riproducibilità delle misure.

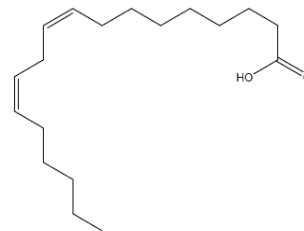
◇ *acido stearico*



(acido ottadecanoico, CH₃(CH₂)₁₆COOH, PM 284.48, Fluka, puriss. p.a. standard per GC, ≥ 99.5 %)

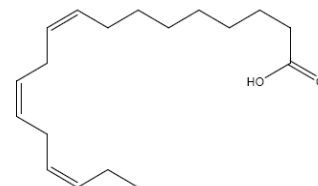
◇ *acido linoleico*

(acido(9Z,12Z)-ottadeca-9,12-dienoico,
H₃(CH₂)₄CH=CHCH₂CH=CH(CH₂)₇COOH, PM
280.45, Fluka, puriss. p.a. standard per
GC, ≥ 99.0 %)



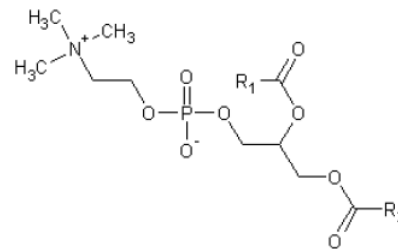
◇ *acido α-linolenico*

(acido (9Z, 12Z, 15Z)-ottadeca-9,12,15-
trienoico, CH₃(CH₂CH=CH)₃(CH₂)₇COOH, PM
278.43, Fluka, purum, ≥ 97.0 % (GC))



◇ *L-α-fosfatidilcolina*

(1,2-diacil-sn-glicerolo-3-fosfocolina,
Sigma, da tuorlo d'uovo, Type XVI-E, ~
99 % (TLC), polvere liofilizzata)
R₁,R₂ = residui di acidi grassi



R₁,R₂ = residui di acidi grassi

Di ciascuno standard è stata preparata una soluzione stock, successivamente diluita per le misure fotofisiche.

La soluzione stock di ciascuno standard è stata preparata sciogliendo 41 mg di lipide in 5 ml di acetone *Uvasol* (c = 8.202 mg/ml = 0.0288 M). Sono stati in seguito preparate sei soluzioni di standard contenenti rispettivamente 5, 10, 20, 30, 40, 50 µl di stock, 3000 µl di PBS e 10 µl di NR. I bianchi corrispondenti a ciascuna soluzione contenevano la stessa quantità di PBS e di NR e volumi di acetone corrispondenti al volume di stock aggiunto. Delle soluzioni di standard e dei rispettivi bianchi sono stati registrati gli spettri di assorbimento e gli spettri di emissione in *FF* eccitando a 488 nm con slitte di 4 nm.

Sono stati inoltre registrati gli spettri di eccitazione in RA a 660nm.

Per le prove sui campioni di lievito, prove di fermentazione sono state avviate sul ceppo psicrofilo obbligato *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 e sul facoltativo *Cryptococcus gilvescens* DBVPG 4722. Entrambi sono stati coltivati in modalità batch in terreno complesso GMY optando per la temperatura di crescita di 4°C. I microrganismi sono stati seguiti come di consueto, monitorando la loro cinetica di crescita e misurando al *tf* del processo la concentrazione cellulare, le rese finali in biomassa secca e lipidi totali. Quindi conseguita la fase stazionaria sono stati effettuati prelievi da entrambe le colture. Questi sono stati destinati alle misure di fotoluminescenza.

La soluzione contenente la sonda fluorescente è stata preparata sciogliendo 1 mg di Nile Red in 1 ml di acetone. Sono stati registrati spettri di assorbimento e di emissione di sospensioni cellulari preparate con 100 µl (o volumi opportunamente diluiti) della coltura cellulare in esame, 2 ml di PBS (Phosphate buffer solution) e 10 µl di soluzione di NR.

Le misure di assorbimento e di emissione sono state effettuate nel laboratorio di chimica organica (Dipartimento di Chimica "Giacomo Ciamician" Università di Bologna) del Prof. Luca Prodi collaborando con il Dott. Massimo Sgarzi e la Dott.ssa Sara Bonacchi.

Acquisizione degli spettri di assorbimento, di emissione e di eccitazione

Per l'acquisizione degli spettri di assorbimento elettronico è stato utilizzato uno spettrofotometro UV/Vis Perkin-Elmer λ 40 a doppio raggio interfacciato ad un computer (CPU).

La registrazione degli spettri di emissione e di eccitazione è stata effettuata utilizzando uno spettrofluorimetro *Perkin Elmer LS 55 Luminescence Spectrometer*, uno spettrofluorimetro

Perkin Elmer LS 50 Luminescence Spectrometer, uno spettrofluorimetro *Edinburgh Analytical Instruments FLS920* equipaggiato con strumentazione per single photon counting e con detector al germanio *Edinburgh Instruments E-Germanium Detector* per misure nel vicino IR e con uno spettrofluorimetro *Fluorolog 3 ISA John Yvon - Spex, Instruments S.A., Inc.*

Nonostante lo step preparativo che prevedeva il lavaggio e la risospensione delle cellule di lievito in un tampone limpido, l'alta densità cellulare rendeva altamente torbidi i campioni, motivo per cui è stato conveniente appoggiare con misure in front-face (FF) le misure classiche in right-angle (RA), in modo da ottenere letture più affidabili della luminescenza dei campioni in esame minimizzando gli effetti di scattering e acquisendo così spettri di emissione più "puliti".

Analisi statistica dei dati

Tutti i dati che saranno riportati nel capitolo successivo e che riferiscono sulla grandezza delle misure cinetiche, sulle rese in termini di biomassa cellulare e lipidi prodotti e sui profili in acidi grassi di ciascun lievito, risultano medie calcolate di almeno tre prove ripetute separatamente nelle medesime condizioni sperimentali.

Le differenze osservate fra le medie di gruppi diversi di lieviti (A, B e C) sono state valutate ricorrendo allo Student's test. All'interno dello stesso gruppo di microrganismi, le differenze fra le medie di esperimenti effettuati a differenti valori di temperatura sono state calcolate mediante il test di Student's su campioni accoppiati. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $P < 0.05$.

Le analisi statistiche sono state effettuate usando GraphPad Prism 4.0 (Graphpad Software, San Diego, CA).

Dati sperimentali

Parte prima: lo screening iniziale

Parametri monitorati dei lieviti psicrofili e mesofili coltivati in modalità batch

I 20 ceppi di lievito della collezione DBVPG isolati dai sedimenti subglaciali e dalle acque di scioglimento dei ghiacciai alpini Forni e Schorzellina insieme a 6 ceppi di specie diverse opportunamente scelte di lieviti mesofili, sono stati coltivati in modalità batch in terreno complesso GMY con un rapporto C:N ottimizzato pari a 40.6:1.

Di tutti i processi sono stati monitorati e confrontati diversi parametri cinetici e non: la velocità specifica di crescita μ_{max} , i coefficienti di resa biomassa/substrato ($Y_{x/s}$) e lipidi/substrato ($Y_{L/s}$) ed infine sono stati esaminati i profili lipidici di ciascun lievito effettuando le analisi quali-quantitative dovute.

Conseguita la fase stazionaria da parte di ogni coltura, la concentrazione di carboidrato residua nel brodo veniva determinata per provare che il conseguimento di questo stadio fosse realmente dovuto al consumo della fonte di carbonio disponibile piuttosto che ad altri eventi riconducibili, per esempio, alle attività metaboliche proprie del microrganismo in fase esponenziale di crescita.

L'informazione sulla crescita microbica è stata comprovata monitorando costantemente, di tutti i processi, le variazioni del pH del terreno, l'incremento dell' OD_{600} della coltura e del peso secco della biomassa ed effettuando conteggi delle CFU su piastre petri a prestabiliti intervalli di tempo.

Infine, di ogni lievito in studio e a più tempi fino all'ingresso in stazionaria sono stati osservati i cambiamenti della morfologia della cellula e la formazione dei corpi lipidici. Le vescicole lipidiche sono state identificate usando opportune sonde fluorescenti.

Le prove in beuta, che hanno composto lo screening iniziale, sono state effettuate alle 3 temperature di 4, 18 e 30°C mentre tutti gli altri parametri del processo venivano mantenuti uguali. Ragione di ciò era capire quanto questa sola variabile incidesse sulla capacità del microrganismo di crescere e di accumulare lipidi. Quindi, i ceppi indagati sono stati clusterizzati proprio sulla base della loro abilità a sviluppare o meno alle 3 diverse temperature specificate.

Definizione dei 3 gruppi di lieviti: A, B e C

Fra gli psicrofili, 5 ceppi, appartenenti alle specie *Leucosporidiella creatinivora* e *Rhodotorula glacialis* e 8 ceppi delle specie riconosciute come *Leucosporidium* spp. e *Mrakia* spp. crescevano a 4°C ma perdevano tale abilità quando le temperature di coltivazione venivano invece fissate a 18 e a 30°C. I 13 ceppi delle 4 specie su indicate sono tutti degli psicrofili obbligati. Questi, sono stati raccolti in un unico gruppo ovvero, gruppo **A**.

Gruppo A

sviluppano
solo a 4°C
ma non a
18°C

Leucosporidium sp. DBVPG 4753
Leucosporidium sp. DBVPG 4799
Rhodotorula creatinivora DBVPG 4794
Mrakia sp. DBVPG 4775
Mrakia sp. DBVPG 4756
Mrakia sp. DBVPG 4757
Mrakia sp. DBVPG 4761
Mrakia sp. DBVPG 4754
Mrakia sp. DBVPG 4801
Rhodotorula glacialis DBVPG 4806
Rhodotorula glacialis DBVPG 4785
Rhodotorula glacialis DBVPG 4786
Rhodotorula glacialis DBVPG 4716

7 ceppi di lievito delle specie *Rhodotorula laryngis*, *Cryptococcus gilvescens* e *Aerobasidium pullulans* crescevano, invece, ad entrambe le temperature di 4 e 18 °C ma non a 30°C. Questi, sono stati raccolti nel gruppo **B**. Le specie che vi appartengono sono tutte della categoria dei lieviti psicrofili facoltativi.

Gruppo B

sviluppano a
4°C e a 18°C

Rhodotorula laryngis DBVPG 4765
Rhodotorula laryngis DBVPG 4772
Aureobasidium pullulans DBVPG 4778
Cryptococcus gilvescens DBVPG 4714
Cryptococcus gilvescens DBVPG 4720
Cryptococcus gilvescens DBVPG 4803
Cryptococcus gilvescens DBVPG 4722

Infine, i 6 mesofili dello studio sono stati coltivati con successo solo alle 2 temperature maggiori di 18 e di 30°C e sono stati raccolti nel terzo gruppo: **C**.

Gruppo C

sviluppano a
18°C e a 30°C

Saccharomyces boulardii L 12
Saccharomyces cerevisiae ATCC 2345
Saccharomyces exiguus L 10
Kluyveromyces marxianus L 3
Pichia farinosa DBVPG 3626
Zygosaccharomyces rouxii DBVPG 6399

Tutte le colture sono state seguite, monitorando l'OD₆₀₀, fino al conseguimento della fase stazionaria di crescita. A questo punto, detto punto finale (*tf*) del processo batch, il campione veniva raccolto e destinato alle misure sul contenuto lipidico.

Il glucosio residuo, qui misurato, risultava sempre generalmente assente o inferiore a 0,3 gL⁻¹.

La conta della vitalità cellulare, eseguita ai due tempi di inoculo (*t0*) e finale, dimostrava che a fine processo il numero di cellule vitali erano in media comprese fra 3,0x10⁸ e 1,8x10⁹ e che avevano subito un incremento medio rispetto all'inoculo di un fattore pari a 10²; indipendentemente dalla temperatura cui il lievito veniva coltivato.

Pertanto, si può dichiarare che in merito al consumo di glucosio disponibile e all'incremento del numero di cellule, le differenze osservate fra i tre gruppi A, B e C e fra i componenti di ogni gruppo in funzione della temperatura di crescita, non sono risultate significative.

La cinetica dello sviluppo batch a 4, 18 e 30°C.

La cinetica di crescita di ogni microrganismo è stata seguita monitorando la variazione dell'OD₆₀₀ della coltura dal t_0 al t_f e convalidando ogni punto che via via disegnava la curva di sviluppo del microrganismo mediante misura del peso secco della biomassa. Dai dati sul liofilizzato, infatti, si ricavava una seconda curva di crescita che doveva essere rapportabile a quella prodotta dalla misura dell'OD₆₀₀.

Ogni prova è stata ripetuta in triplo così che per ogni lievito si confrontassero 3 cinetiche di crescita, osservate nelle stesse condizioni sperimentali.

Quando si analizza la cinetica di crescita degli psicrofili obbligati che crescono solo alla temperatura più bassa fra le tre stabilite, si nota che la fase esponenziale inizia sempre allo stesso modo, ovvero, dopo almeno 72 ore dall'inoculo in beuta. Tuttavia, al di là di questa somiglianza netta, risulta chiaro che la cinetica di sviluppo a 4°C è un comportamento specie-specifico (genere-specifico nel caso di quei ceppi per i quali manca tuttora la classificazione di specie quali *Leucosporidium* sp. e *Mrakia* sp.). Infatti, raggruppando i microrganismi secondo la specificazione che di loro ha riconosciuto il Prof. Buzzini, diventa possibile individuare una similarità sia nella cinetica di crescita (per esempio nei tempi di inizio e fine della fase esponenziale e nei valori della μ_{max}) che nell'andamento della curva di sviluppo del microrganismo. Pertanto, al conseguimento della fase stazionaria risulta somigliante, per ceppi della stessa specie, la resa in biomassa prodotta, pur verificando, talvolta, qualche piccola eccezione.

Nelle figure successive sono riportati gli andamenti di crescita di 2 specie diverse di psicrofili obbligati a 4°C. Le tre linee di tre diversi colori rappresentano tre prove ripetute nelle stesse condizioni sperimentali.

Mrakia sp. DBVPG 4756

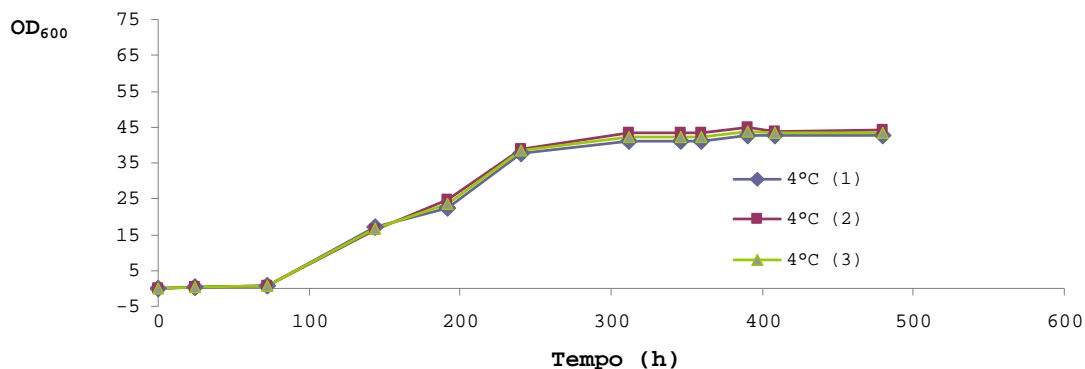


Fig.1. Curva di crescita del ceppo psicrofilo obbligato *Mrakia* sp. DBVPG 4756 coltivato in modalità batch in beuta a 4°C.

Rhodotorula glacialis DBVPG 4756

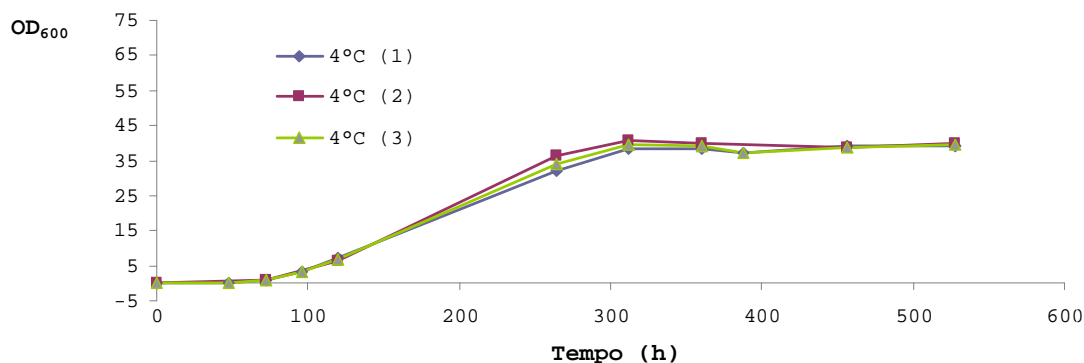


Fig.2. Curva di crescita del ceppo psicrofilo obbligato *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4786 coltivato in modalità batch in beuta a 4°C.

Raggiunta la fase stazionaria, gli psicrofili obbligati conseguono valori mediamente molto elevati di densità ottica e di peso secco, caratteristica che appare più evidente quando questi dati vengono confrontati con quelli ricavati sia dagli psicrotrofi che dai mesofili, indipendentemente dalla temperatura cui i lieviti, dei gruppi B e C, sono coltivati (4 e 18°C i primi, 18 e 30°C i secondi). Questi dati sono riportati nella *tabella 1*; dalla loro analisi è possibile già prevedere quali saranno i coefficienti di resa in biomassa che saranno presentati solo nel paragrafo successivo.

Gruppo	Strain	OD600			DW		
		4°C	18°C	30°C	4°C	18°C	30°C
A	<i>Leucosporidium</i> sp. DBVPG 4753	38,33	-	-	10,48	-	-
	<i>Leucosporidium</i> sp. DBVPG 4799	35,80	-	-	11,98	-	-
	<i>Rhodotorula creatinivora</i> DBVPG 4794	46,95	-	-	11,59	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4775	35,39	-	-	13,17	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4756	40,53	-	-	11,19	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4757	40,53	-	-	11,76	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4761	41,92	-	-	11,88	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4754	38,60	-	-	11,22	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4801	40,22	-	-	11,45	-	-
	<i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4806	35,10	-	-	10,36	-	-
	<i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4785	36,87	-	-	15,84	-	-
	<i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4786	39,27	-	-	13,23	-	-
	<i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4716	30,97	-	-	15,50	-	-
	MEDIA ^(a)	38,50			12,28		
DEV. ST ^(a)	3,90			1,72			
B	<i>Rhodotorula laryngis</i> DBVPG 4765	23,30	29,39	-	9,55	8,80	-
	<i>Rhodotorula laryngis</i> DBVPG 4772	20,47	31,65	-	7,96	8,63	-
	<i>Aureobasidium pullulans</i> DBVPG 4778	16,18	12,05	-	7,25	7,97	-
	<i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4714	31,46	22,55	-	7,07	8,35	-
	<i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4720	30,46	21,86	-	8,91	10,15	-
	<i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4803	36,82	16,80	-	12,58	6,56	-
	<i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4722	45,15	15,28	-	12,26	7,43	-
	MEDIA ^(a)	29,12	21,37		9,37	8,27	
	DEV. ST ^(a)	10,00	7,26		2,26	1,13	
	C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L 12	-	7,12	12,69	-	4,11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2345		-	5,56	10,48	-	3,27	3,46
<i>Saccharomyces exiguus</i> L 10		-	3,06	6,90	-	1,01	2,29
<i>Kluyveromyces marxianus</i> L 3		-	18,93	18,00	-	6,45	8,53
<i>Pichia farinosa</i> DBVPG 3626		-	19,32	25,38	-	3,82	5,96
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> DBVPG 6399		-	1,7	12,74	-	2,42	3,56
MEDIA ^(a)			9,28	14,37		3,51	4,88
DEV. ST ^(a)			7,86	6,49		1,66	2,25

^(a) media di valori di una colonna (p<0,05); per ogni ceppo il valore riportato è una media di almeno 3 esperimenti, deviazione standard almeno inferiore a 0.04.

Tab.1. Elenco dei valori di OD₆₀₀ e peso secco (DW: dry weight) misurati al tempo finale della fermentazione batch per i gruppi A, B e C.

Anche gli psicrofili facoltativi (*fig.3* e *fig.4*) mostrano una somiglianza generale nei parametri cinetici, quando si vanno a considerare le stesse specie di microrganismi e la stessa temperatura (4 o 18°C). Infatti, la cinetica di sviluppo degli

psicrotrofi coltivati a 18°C è sensibilmente diversa rispetto a quella degli stessi a 4°C.

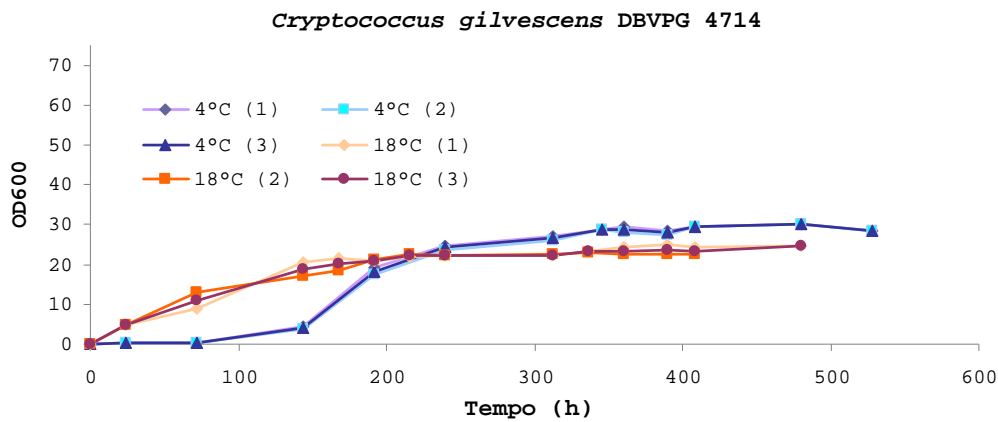


Fig.3. Curva di crescita del ceppo psicrofilo facoltativo *Cryptococcus gilvescens* DBVPG 4714 coltivato in modalità batch in beuta a 4 e a 18°C.

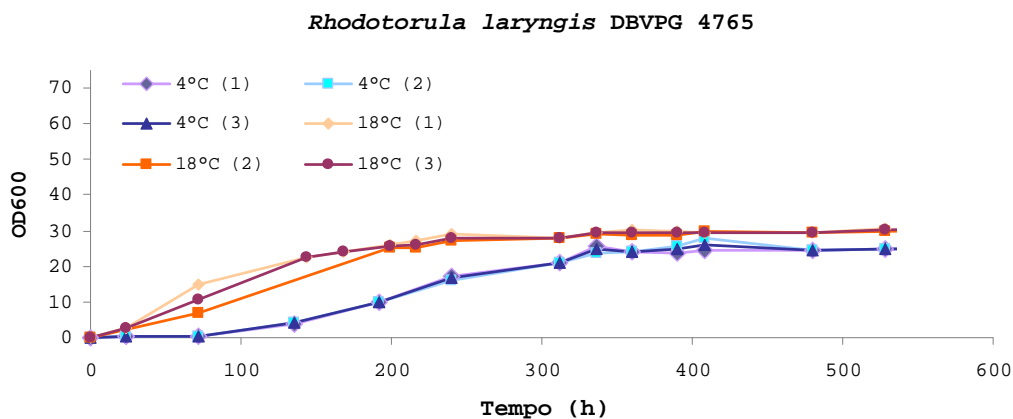


Fig.4. Curva di crescita del ceppo psicrofilo facoltativo *Rhodotorula laryngis* DBVPG 4765 coltivato in modalità batch in beuta a 4 e a 18°C.

Anzitutto la fase di lag si accorcia a sole 24 ore rispetto alle 72 ore dei 4°C. Perciò un microorganismo psicrotrofo che cresce ad entrambe le temperature, a 18°C inizia la sua fase esponenziale dopo un tempo di adattamento minore rispetto a quello necessario a 4°C. Al di là della cinetica più spinta, a 18°C accade che le rese in biomassa siano mediamente più basse rispetto a quelle che si ottengono a 4°C, tuttavia, per alcune specie la differenza sembra essere meno evidente che per altre mentre *Rhodotorula laryngis* rappresenta l'eccezione in tutto

il gruppo B, infatti ha, in merito alle rese in biomassa prodotta, un comportamento esattamente contrario producendo di più alla temperatura più alta.

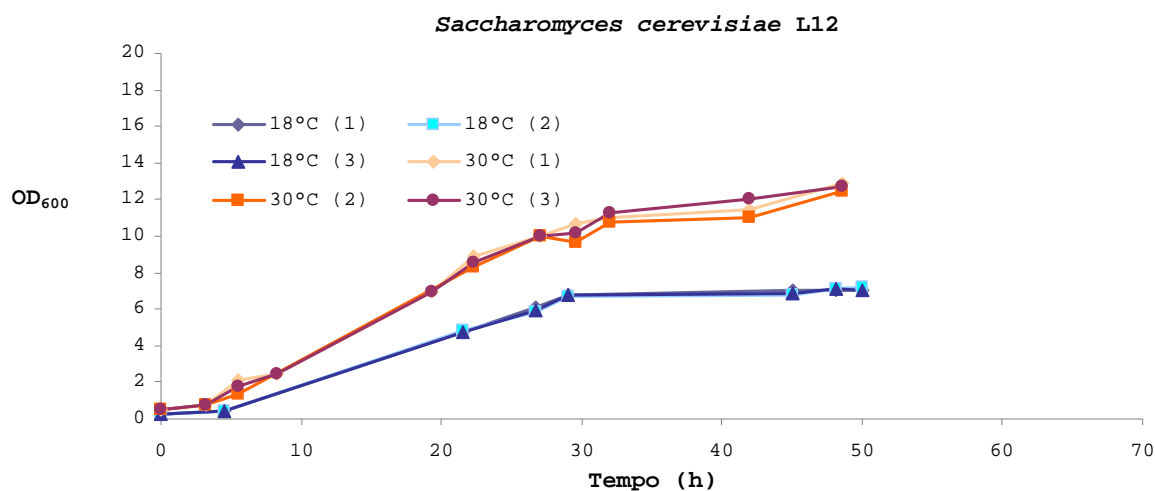


Fig. 5. Curva di crescita del ceppo di lievito mesofilo *Saccharomyces cerevisiae* L12 coltivato in modalità batch in beuta a 18 e a 30°C.

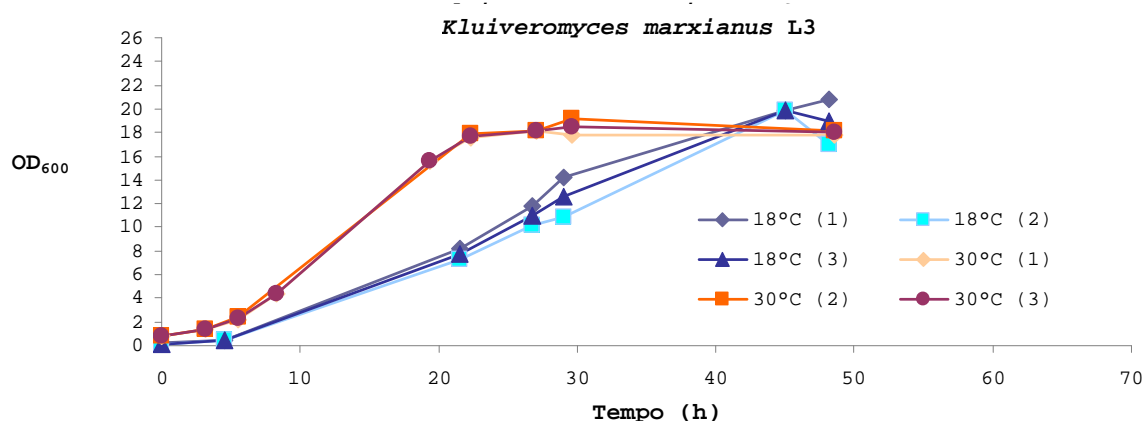


Fig. 6. Curva di crescita del ceppo di lievito mesofilo *Kluyveromyces marxianus* L3 coltivato in modalità batch in beuta a 18 e a 30°C.

I lieviti mesofili (*fig. 5* e *fig. 6*) inseriti nello studio come elementi di confronto, poiché più noti degli psicrofili, hanno mostrato dinamiche di sviluppo diverse a 18 e 30°C e, sempre, specie specifiche. Per questo gruppo le densità ottiche e il peso della biomassa liofilizzata, al tempo finale, sono risultati quasi sempre mediamente più alti alla maggiore delle due temperature di crescita sperimentate con l'eccezione di

Kluiveromyces marxianus, che invece, seppur con cinetiche diverse, raggiungeva all'ingresso in stazionaria, ad entrambe le temperature, circa lo stesso prodotto in biomassa.

Velocità specifica di crescita μ_{\max} e resa in biomassa $Y_{x/s}$

Il confronto delle velocità specifiche di crescita (μ) e dei coefficienti di resa in biomassa ($Y_{x/s}$) fra i tre gruppi A, B e C alle diverse temperature è stato sintetizzato nella tabella 2. La μ_{\max} di ogni ceppo, in ogni condizione di temperatura, è stata calcolata nel pieno della fase logaritmica di crescita e il valore riportato in tabella è il risultato medio di tre prove ripetute, mentre, per calcolare il coefficiente di resa di ogni coltura, è stato atteso il raggiungimento della fase stazionaria.

In merito alla resa $Y_{x/s}$ ma soprattutto alla μ_{\max} , il comportamento dei singoli ceppi all'interno di ogni gruppo e per una stessa temperatura, non è mai parso tale da poterlo con buona ragione considerare specie specifico. Tuttavia, se si va a considerare la temperatura come variabile, allora, si possono fare alcune considerazioni interessanti. Anzitutto, si nota che la μ_{\max} media esibita da tutti i lieviti cresciuti a 4°C (gruppo A e B) è di $0,039h^{-1}$, senza differenze significative fra gli psicrofili obbligati e facoltativi. D'altro canto, quando questi ultimi sono fatti crescere a 18°C piuttosto che a 4°C, la loro μ_{\max} media diventa $0,087h^{-1}$: significativamente più alta di quella osservata a 4°C.

Lo stesso comportamento è riproposto dai lieviti mesofili (gruppo C), dei quali, la velocità specifica di crescita pure aumenta alla maggiore delle 2 temperature di crescita sperimentate (μ_{\max} media pari a $0,147h^{-1}$ a 18°C e a $0,261h^{-1}$ a 30°C).

Infine se si considera la stessa temperatura di 18°C, gli psicrofili facoltativi crescono a velocità significativamente inferiori se confrontati con i mesofili (μ_{\max} media = $0,087h^{-1}$ e $0,147h^{-1}$, rispettivamente).

Gruppo	Strain	μ_{MAX} (h ⁻¹) ^(a)			$Y_{X/S}$ ^(b)		
		4°C	18°C	30°C	4°C	18°C	30°C
A	<i>Leucosporidium</i> sp. DBVPG 4753	0.022	-	-	0.30	-	-
	<i>Leucosporidium</i> sp. DBVPG 4799	0.032	-	-	0.34	-	-
	<i>Rhodotorula creatinivora</i> DBVPG 4794	0.035	-	-	0.33	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4775	0.039	-	-	0.37	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4756	0.035	-	-	0.32	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4757	0.033	-	-	0.33	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4761	0.054	-	-	0.34	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4754	0.036	-	-	0.32	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4801	0.038	-	-	0.33	-	-
	<i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4806	0.051	-	-	0.29	-	-
	<i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4785	0.053	-	-	0.45	-	-
	<i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4786	0.046	-	-	0.38	-	-
	<i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4716	0.036	-	-	0.44	-	-
	MEDIA ^(c)	0.039			0.35		
DEV. ST	0.009			0.05			
B	<i>Rhodotorula laryngis</i> DBVPG 4765	0.037	0.060	-	0.30	0.28	-
	<i>Rhodotorula laryngis</i> DBVPG 4772	0.025	0.035	-	0.25	0.26	-
	<i>Aureobasidium pullulans</i> DBVPG 4778	0.045	0.064	-	0.21	0.23	-
	<i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4714	0.032	0.156	-	0.23	0.24	-
	<i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4720	0.037	0.127	-	0.29	0.29	-
	<i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4803	0.046	0.087	-	0.36	0.21	-
	<i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4722	0.053	0.077	-	0.35	0.21	-
	MEDIA ^(c)	0.039	0.087		0.28	0.24	
	DEV. ST	0.010	0.041		0.06	0.03	
	C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L 12	-	0.140	0.249	-	0.13
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2345		-	0.151	0.267	-	0.10	0.11
<i>Saccharomyces exiguus</i> L 10		-	0.147	0.323	-	0.07	0.07
<i>Kluyveromyces marxianus</i> L 3		-	0.175	0.233	-	0.20	0.26
<i>Pichia farinosa</i> DBVPG 3626		-	0.171	0.305	-	0.19	0.18
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> DBVPG 6399		-	0.099	0.192	-	0.18	0.11
MEDIA ^(c)			0.147	0.261		0.15	0.15
DEV. ST			0.027	0.048		0.05	0.07

^(a) Media dei valori di 3 esperimenti; per ogni ceppo, la deviazione standard è sempre almeno minore a 0.05 h⁻¹.

^(b) Media dei valori di 3 esperimenti; per ogni ceppo, la deviazione standard è sempre almeno minore a 0.04.

^(c) Media dei valori della colonna (t-test, p < 0.05).

Tab.2. Confronto della velocità specifiche di crescita e delle rese in biomassa/substrato fra lieviti psicrofili obbligati (A), facoltativi (B) e mesofili (C), coltivati in terreno complesso GMY a 4, 18 e 30°C.

A fronte di quanto appena detto, se si raffrontano adesso le rese in biomassa dei tre gruppi, si noterà che proprio gli psicrofili obbligati (gruppo A), che alla loro temperatura di sviluppo (4°C) mostrano il più basso valore in velocità di

crescita, rivelano pure il più alto valore in biomassa prodotta per stessa quantità di substrato consumato. Infatti, il valor medio della loro $Y_{x/s}$ è 0.35, più del doppio di quello dei mesofili che hanno una resa uguale a 0.15 ad entrambe le temperature di crescita (18 o 30°C). Il valor medio della $Y_{x/s}$ degli psicrofili facoltativi (gruppo B), che crescono sia a 4 che a 18°C, non è significativamente differente alle due temperature (0.28 e 0.24, rispettivamente) tuttavia, se si confronta a 4°C il dato di questi con quello esibito dal primo gruppo si noterà che gli psicrofili obbligati hanno un valor medio di resa in biomassa decisamente superiore benché le condizioni di crescita siano le stesse di quelle del gruppo B (0.35 e 0.28, rispettivamente). Questi, sono dati tutti esposti in *tabella 2*.

Resa in lipidi ($Y_{L/x}$) e composizione degli estratti

I lipidi totali sono stati estratti solo quando veniva raggiunta la fase stazionaria della coltura batch, ovvero dopo 2 giorni di fermentazione per i mesofili e dopo 14 giorni per gli psicrofili obbligati e facoltativi. Per ogni ceppo di ciascuno dei 3 gruppi l'estrazione dei lipidi è stata ripetuta tre volte separatamente.

Il rapporto medio misurato lipidi/biomassa ($Y_{L/x}$) per ogni ceppo di psicrofilo obbligato e facoltativo e per ogni mesofilo in esame, è stato valutato all'interno di ogni gruppo e per i gruppi B e C anche in funzione della temperatura di crescita.

Infine, ad ogni gruppo è stato assegnato un valore medio unico, così che risultassero più immediate le eventuali differenze di comportamento in merito all'accumulo di lipidi totali, fra i diversi gruppi di lieviti A, B e C, indipendentemente dalla temperatura, e anche, in funzione della temperatura sul comportamento di ogni categoria (*tabella 3*).

Gruppo	Strain	$Y_{L/X}^{(b)}$			UI ^(b)		
		4°C	18°C	30°C	4°C	18°C	30°C
A	<i>Leucosporidium</i> sp. DBVPG 4753	0.28	-	-	1.02	-	-
	<i>Leucosporidium</i> sp. DBVPG 4799	0.58	-	-	1.06	-	-
	<i>Rhodotorula creatinivora</i> DBVPG 4794	0.46	-	-	0.95	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4775	0.25	-	-	1.55	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4756	0.17	-	-	1.46	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4757	0.34	-	-	1.21	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4761	0.34	-	-	1.50	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4754	0.19	-	-	1.44	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4801	0.13	-	-	0.92	-	-
	<i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4806	0.42	-	-	1.05	-	-
	<i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4785	0.21	-	-	1.30	-	-
	<i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4786	0.17	-	-	1.78	-	-
	<i>Rhodotorula glacialis</i> DBVPG 4716	0.08	-	-	0.86	-	-
	MEDIA^(c)	0.28			1.24		
	DEV. ST	0.15			0.29		
B	<i>Rhodotorula laryngis</i> DBVPG 4765	0.07	0.14	-	1.03	1.06	-
	<i>Rhodotorula laryngis</i> DBVPG 4772	0.28	0.43	-	0.97	0.90	-
	<i>Aureobasidium pullulans</i> DBVPG 4778	0.34	0.10	-	0.91	1.06	-
	<i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4714	0.33	0.27	-	0.90	0.71	-
	<i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4720	0.21	0.27	-	0.82	0.82	-
	<i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4803	0.34	0.22	-	1.01	0.74	-
	<i>Cryptococcus gilvescens</i> DBVPG 4722	0.26	0.36	-	0.91	0.83	-
	MEDIA^(c)	0.26	0.25		0.94	0.88	
	DEV. ST	0.09	0.11		0.07	0.14	
	C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L 12	-	0.44	0.21	-	0.59
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2345		-	0.20	0.34	-	0.62	0.60
<i>Saccharomyces exiguus</i> L 10		-	0.72	0.51	-	0.55	0.63
<i>Kluyveromyces marxianus</i> L 3		-	0.21	0.12	-	0.98	0.75
<i>Pichia farinosa</i> DBVPG 3626		-	0.57	0.29	-	0.86	0.77
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> DBVPG 6399		-	0.43	0.31	-	0.89	0.76
MEDIA^(c)			0.43	0.30		0.75	0.71
DEV. ST			0.20	0.13		0.18	0.07

^(b) Media dei valori di 3 esperimenti; per ogni ceppo, la deviazione standard è sempre almeno minore a 0.04.

^(c) Media dei valori della colonna (t-test, p < 0.05).

Tab.3. Confronto del rapporto lipidi totali estratti per grammo di biomassa ($Y_{L/X}$) e indice di insaturazione (UI) fra lieviti psicrofili obbligati (gruppo A), facoltativi (gruppo B) e mesofili (gruppo C) in fase stazionaria. Terreno complesso GMY.

Il valor medio dei due coefficienti di resa in prodotto lipidico $Y_{L/X}$ dei gruppi A e B, calcolati entrambi quando 4°C è la temperatura di crescita comune delle due serie, sono 0.27 e 0.26 rispettivamente; è chiaro che la differenza fra i due valori medi riportati è statisticamente non rilevante. La stessa osservazione emerge quando si confrontano i coefficienti di resa $Y_{L/X}$ che risultano dagli psicrofili facoltativi (gruppo B) cresciuti a 4°C e a 18°C; i due risultati, 0.26 a 4°C e 0.25 a 18°C, sono infatti simili. A questo punto, sembrerebbe che la variabile temperatura, sia determinante solo per i mesofili, nei quali la $Y_{L/X}$ media che risulta alle due temperature confrontate di 18 e di 30°C è rispettivamente 0.43 e 0.30. Questo risultato misura quell'aumento significativo che si ha in estratto lipidico dai mesofili quando sono coltivati a 30°C piuttosto che a temperatura inferiore. Infine, quando si stabiliscono i 18°C come comune temperatura di crescita, la differenza fra le rese in lipidi totali $Y_{L/X}$ dei due gruppi B e C non risulta affatto significativa, questo, per il comportamento ceppo specifico dei singoli componenti delle due categorie di lieviti raffrontate, che si riflette su un valore di deviazione standard troppo elevato. Del resto, se questa analisi fosse estesa anche al gruppo A e se si considerassero tutte e tre le temperature, si noterebbe che la capacità di accumulare lipidi nella cellula microbica è da considerarsi una caratteristica perfino ceppo specifica.

La composizione relativa (%) degli acidi grassi componenti le frazioni lipidiche estratte con *metodo Folch* da tutti i singoli ceppi di lievito dello studio e a tutte le temperature di crescita (4, 18 e 30°C), è stata determinata analizzando i cromatogrammi degli estratti; i dati acquisiti, sono riportati nella tabella che segue.

Gruppo	Strain	C14 ^(a)			C16 ^(a)			C16:1 ^(a)			C18 ^(a)			C18:1 ^(a)			C18:2 ^(a)			C18:3 ^(a)		
		4°C	18°C	30°C	4°C	18°C	30°C	4°C	18°C	30°C	4°C	18°C	30°C	4°C	18°C	30°C	4°C	18°C	30°C	4°C	18°C	30°C
A	<i>Leucosporidium</i> sp. DBVPG 4753	1,6	-	-	18,5	-	-	3,0	-	-	0,3	-	-	58,3	-	-	12,9	-	-	4,9	-	-
	<i>Leucosporidium</i> sp. DBVPG 4799	1,0	-	-	17,1	-	-	2,2	-	-	0,6	-	-	60,5	-	-	12,1	-	-	6,5	-	-
	<i>R. creatinivora</i> DBVPG 4794	2,6	-	-	25,5	-	-	3,0	-	-	1,9	-	-	52,5	-	-	3,4	-	-	11,0	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4775	0,3	-	-	15,7	-	-	3,5	-	-	4,7	-	-	28,7	-	-	17,8	-	-	29,1	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4756	0,6	-	-	19,0	-	-	2,2	-	-	9,0	-	-	23,7	-	-	15,7	-	-	29,2	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4757	0,0	-	-	20,5	-	-	1,2	-	-	3,3	-	-	45,4	-	-	14,9	-	-	14,7	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4761	0,2	-	-	16,9	-	-	2,9	-	-	1,0	-	-	36,5	-	-	17,3	-	-	25,2	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4754	0,7	-	-	18,3	-	-	3,2	-	-	6,8	-	-	27,4	-	-	16,7	-	-	26,6	-	-
	<i>Mrakia</i> sp. DBVPG 4801	0,0	-	-	23,6	-	-	2,7	-	-	1,6	-	-	57,9	-	-	10,9	-	-	3,4	-	-
	<i>R. glacialis</i> DBVPG 4806	5,3	-	-	22,1	-	-	2,5	-	-	1,4	-	-	45,4	-	-	11,5	-	-	11,1	-	-
	<i>R. glacialis</i> DBVPG 4785	4,8	-	-	14,5	-	-	1,4	-	-	2,6	-	-	39,4	-	-	21,2	-	-	15,4	-	-
	<i>R. glacialis</i> DBVPG 4786	2,2	-	-	13,9	-	-	0,7	-	-	5,4	-	-	15,5	-	-	24,6	-	-	37,3	-	-
	<i>R. glacialis</i> DBVPG 4716	0,3	-	-	25,5	-	-	1,8	-	-	10,8	-	-	43,4	-	-	14,2	-	-	4,1	-	-
		Media ^(b)	1,5			19,3			2,3			3,8			41,1			14,8			16,9	
	SD	1,7			3,9			0,9			3,3			14,3			5,2			11,4		
B	<i>R. laryngis</i> DBVPG 4765	0,8	0,0	-	26,0	23,3	-	1,8	0,0	-	1,2	2,1	-	39,4	45,8	-	30,8	25,8	-	0,0	3,0	-
	<i>R. laryngis</i> DBVPG 4772	0,9	0,9	-	22,6	29,1	-	0,7	1,9	-	7,9	1,4	-	41,6	44,8	-	23,3	21,8	-	2,8	0,0	-
	<i>A. pullulans</i> DBVPG 4778	0,0	0,0	-	22,5	14,2	-	0,0	0,9	-	4,1	1,7	-	57,9	61,1	-	13,0	22,2	-	2,4	0,0	-
	<i>C. gilvescens</i> DBVPG 4714	0,9	1,0	-	26,3	19,0	-	0,2	0,4	-	15,1	11,4	-	23,9	64,4	-	32,6	3,0	-	0,0	0,0	-
	<i>C. gilvescens</i> DBVPG 4720	2,2	1,1	-	26,2	18,5	-	0,0	0,0	-	19,1	11,2	-	22,7	55,9	-	29,5	12,9	-	0,0	0,0	-
	<i>C. gilvescens</i> DBVPG 4803	0,7	0,6	-	21,0	18,0	-	0,4	0,0	-	8,9	11,5	-	37,3	65,0	-	31,4	4,5	-	0,0	0,0	-
	<i>C. gilvescens</i> DBVPG 4722	0,0	0,0	-	17,1	20,7	-	0,0	0,0	-	2,8	1,8	-	69,0	72,1	-	11,1	5,4	-	0,0	0,0	-
		Media ^(b)	0,8	0,5		23,1	20,4		0,4	0,5		8,4	5,9		41,7	58,4		24,5	13,7		0,7	0,4
	SD	0,73	0,52		3,40	4,70		0,66	0,72		6,6	5,1		16,9	10,2		5,1	9,6		1,27	1,14	
C	<i>S. cerevisiae</i> L 12	-	3,1	1,6	-	24,1	21,0	-	31,1	40,3	-	11,9	3,9	-	25,2	32,2	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 2345	-	2,4	1,2	-	21,0	21,7	-	32,2	28,6	-	13,4	16,2	-	28,6	31,0	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0
	<i>S. exiguus</i> L 10	-	3,6	4,3	-	28,9	20,3	-	21,9	35,4	-	15,7	14,1	-	23,2	22,1	-	4,5	2,3	-	0,0	0,0
	<i>K. marxianus</i> L 3	-	1,1	1,8	-	25,2	26,9	-	11,2	9,0	-	8,2	16,8	-	29,6	29,8	-	14,9	8,3	-	8,7	6,2
	<i>P. farinosa</i> DBVPG 3626	-	0,7	0,9	-	20,4	23,5	-	2,6	2,5	-	8,3	8,5	-	52,2	53,9	-	15,6	10,4	-	0,0	0,0
	<i>Z. rouxii</i> DBVPG 6399	-	1,7	1,2	-	16,9	17,5	-	12,1	9,9	-	11,2	11,5	-	38,8	52,3	-	18,7	6,7	-	0,0	0,0
		Media ^(b)		2,1	1,8		22,8	21,8		18,5	20,9		11,5	11,8		32,9	36,7		9,0	4,7		1,5
	SD		1,2	1,2		4,2	3,2		11,9	15,6		2,9	4,9		10,8	13,1		8,4	4,4		3,5	2,5

^(a) Ogni dato % per ogni ceppo è la media di 3 prove ripetute separatamente; standard deviation almeno minore a 0.5.

^(b) Media dei valori di una colonna per uno stesso gruppo (p < 0.05).

Tab.4. Composizione relativa (%) in acidi grassi degli estratti lipidici ricavati dagli psicrofilo obbligati (gruppo A), facoltativi (gruppo B) e dai mesofili (gruppo C), in fase stazionaria, coltivati in GMY medium, a 4, 18 e 30°C.

Desiderando rendere più semplice l'analisi della gran massa di dati raccolta, l'informazione più importante circa il grado di insaturazione degli acidi grassi di ogni ceppo, è stata riassunta in un indice unico e chiaro, chiamato indice di insaturazione (UI) (tabella 3). Tale indice viene fuori dal numero di insaturazioni presenti negli acidi grassi moltiplicato per la loro quantità relativa: maggiore è il suo valore, maggiore è il grado di insaturazione medio degli acidi grassi del microrganismo.

Alla luce dell'analisi dei dati, alcune considerazioni possono essere estese a tutti i lieviti inseriti nello studio prescindendo sia dalla categoria di appartenenza di questi che dalla temperatura di crescita. Innanzitutto, in tutti i lieviti sono stati trovati solo acidi grassi lineari sia saturi che insaturi, che con una lunghezza di catena compresa fra 14 e 18 atomi di carbonio, rappresentano sempre almeno il 97,6% degli acidi grassi totali presenti. Inoltre, la quantità relativa di acidi grassi insaturi oltre il palmitoleico (C16:1,n-9), l'oleico (C18:1,n-9), il linoleico (C18:2,n-6) e l' α -linolenico (C18:3,n-3) si può considerare trascurabile sebbene sia tuttavia la componente qualitativamente più importante.

Se si fa un confronto fra categorie, si noterà che i lieviti psicrofili obbligati e facoltativi che crescono alla stessa temperatura di 4°C esibiscono diversi valori dell'indice UI, ovvero, 1.24 gli obbligati e 0.94 i facoltativi. Se poi, questo dato lo si valuta assieme al profilo degli estratti lipidici dei due gruppi, si vedrà pure che quella differenza è dovuta soprattutto al diverso numero di doppi legami presenti sugli acidi grassi con 18 atomi di carbonio. Nel gruppo A, gli acidi grassi C18:2 e C18:3 rappresentano rispettivamente il 14.8 ed il 16.9%, mentre nel gruppo B, queste percentuali sono restituite al 24.5 e allo 0.7%. La differenza nei relativi contenuti in particolare di acido α -linolenico, influisce molto, per l'apprezzabile grado di insaturazione di questo acido grasso, sulla differenza finale negli indici stessi. La

quantità relativa di C18:1, invece, non si può dire che vari in modo apprezzabile fra i due gruppi di psicrofili, obbligati e facoltativi.

Qualora poi, si considerasse solo il gruppo B con la temperatura unica variabile, si noterebbero prima di tutto le differenze sulla composizione in acidi grassi dei ceppi cresciuti a temperature diverse, 4 e 18°C. Soprattutto, è diverso il contenuto di C18:1, maggiore a 18°C piuttosto che a 4 (58.4 e 41.7%, rispettivamente) e di C18:2, per cui, invece, vale il contrario, è maggiore a 4°C (24.5%) mentre si riduce a 18 (13.7%). Allo stesso modo, non sono state notate differenze consistenti sul profilo degli acidi grassi dei lieviti mesofili quando sono coltivati alle due temperature di 18 e di 30°C.

Sicuramente considerevoli sono state le diversità constatate nella composizione quali-quantitativa dei lipidi dei lieviti mesofili (gruppo C) e psicrofili facoltativi (gruppo B), quando, entrambe le categorie sono state coltivate alla temperatura comune di 18°C. I mesofili sono più ricchi in contenuto percentuale di acidi grassi saturi rispetto agli psicrofili facoltativi (36.3 e 26.8%, sono i valori rispettivi) e, per di più, risulta minore la lunghezza media della catena dell'acido grasso. Considerando la serie totale dei C:16 (C16:0 e C16:1) riconosciuti sul cromatogramma dei lieviti dei gruppi in esame, questa raggiunge il 41.3% degli acidi grassi totali nel gruppo C per poi dimezzarsi nel gruppo B (20.8%); mentre la serie per intero dei C18 (C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3), a prescindere dal loro grado di insaturazione, rappresenta il 54.9% degli acidi grassi totali nei mesofili e il 78.4% di quelli degli psicrotrofi, gruppo B. Infine, in entrambi i raggruppamenti cresciuti a 18°, l'acido grasso predominante risulta il monoinsaturo acido oleico (C18:1), capostipite della serie degli omega-6, che tocca percentuali del 58.4% nel gruppo B e del 32.9% nel gruppo C. Negli psicrofili facoltativi il contenuto di acido oleico, a 4°C, si riduce al 41.7% a fronte di un aumento notevole del C18

immediatamente più insaturo (C18:2), che viene rappresentato con un 24.5% invece che con il 13.7% dei 18°C. L'acido oleico è pure l'acido grasso più abbondante negli psicrofili obbligati, tuttavia in questo gruppo segue per abbondanza l'acido α -linolenico con 3 insaturazioni e una presenza relativa del 16.9% piuttosto che l'acido C18:2 (14.8%) che invece è, negli psicrofili facoltativi che crescono a 4°C, il secondo acido grasso più abbondante (24.5%) dopo, appunto, l'oleico. Per contro, non vi è differenza significativa in contenuto percentuale di acidi grassi C18 nei mesofili cresciuti a 18 piuttosto che a 30°C. Tuttavia, i mesofili se raffrontati con gli psicrofili, a prescindere dai 18 o dai 30°C, vantano quantità particolarmente elevate di C14:0, C16:1 e C18:0 e particolarmente basse di C18:2 (tabella 4).

Con l'obiettivo di capire se le differenze nella composizione lipidica fra le cellule di lievito psicrofile e mesofile fossero espressione di specifici adattamenti metabolici ad ambienti diversi, i dati, prima separati fra i tre gruppi A, B e C, sono stati riassunti in due medie; l'una riferita al solo gruppo degli psicrofili (obbligati e facoltativi), l'altra a quello dei mesofili. In questo confronto, la temperatura era tenuta quale unica variabile.

Anzitutto, è stato osservato che la lunghezza media della catena carboniosa degli acidi grassi è minore nei mesofili che negli psicrofili. I C16 totali realizzano, infatti, rispettivamente il 42.0 e il 21.9% degli acidi grassi estratti in toto mentre i C18 totali raggiungono il 54.6% nei lieviti mesofili e il 76.8% negli altri. Per quanto riguarda l'indice di insaturazione, questo ha valori maggiori negli psicrofili, dove è mediamente pari a 1.07, che nei mesofili il cui valore è invece valutato 0.74. Nel particolare, i C18:2 e i C18:3 sono relativamente più abbondanti negli psicrofili (17.0 e 8.7%) che nei mesofili dove il loro contenuto percentuale si riduce sensibilmente (6.85 e 1.2%). In questi ultimi, inoltre, come già precedentemente ricordato, il maggior contributo

all'indice di insaturazione è dato dal ricco contenuto in acido palmitoleico (C16:1) che da solo rappresenta il 19.7% degli acidi grassi totali, quando è appena l'1.4% negli psicrofili. Infine, per quanto concerne la componente satura più rappresentativa, non sono state evidenziate differenze consistenti sul C16:0, mentre l'acido oleico, C18:0, è decisamente più abbondante nei lieviti mesofili (11.6%), meno negli psicrofili (5.5%).

Parte seconda: prove di fermentazione in bioreattore

Nella seconda fase del lavoro sono state messe a punto due prove di fermentazione in bioreattore.

La prima è stata definita su un ceppo di lievito psicrofilo obbligato, *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785, scelto tra quelli che dallo studio preliminare avevano dato rese lipidiche, quantitative e qualitative, migliori. Si tratta di una prova realizzata sperimentando diverse temperature di crescita. La seconda ha coinvolto un microfungo marino della famiglia dei Thraustochytridi, genere *Schizochytrium*, specie *limacinum*, ceppo SR-21. *S. limacinum* sviluppa alla temperatura ottimale di 25°C in aerazione costante. Questo organismo è stato scelto come parametro di riferimento utile, essendo disponibile un'ampia letteratura riguardante il suo normale impiego per la produzione industriale di acidi grassi.

L'effetto del rapporto C:N sulla cinetica di crescita e sull'accumulo dei lipidi in *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785

Per meglio comprendere come un rapporto C:N correttamente definito poteva condizionare la cinetica di crescita e l'accumulo dei lipidi di un lievito psicrofilo, *R. glacialis* DBVPG 4785 è stato coltivato alla temperatura di 10°C in terreno GMY contenente 4 o 30 g/L di glucosio, corrispondenti a rapporti C:N (w/v) di 8:1 e di 40:1 rispettivamente.

Crescita su terreno GMY a basso C:N

La coltura contenente 4 g/L di glucosio è cresciuta con una velocità specifica di crescita di 0.046 h^{-1} ed ha esaurito la fonte di carbonio disponibile quando erano trascorse circa 48h dall'inoculo. In corrispondenza dell'esaurimento del glucosio, la coltura è entrata in fase stazionaria relativamente alla concentrazione di cellule ($2.1 \cdot 10^8 \text{ cells/ml}$) e all'andamento del peso secco (3.6 g/L), confermata anche dai valori di torbidità (OD_{600} 5.66) (figura 7). Il coefficiente di resa biomassa/substrato ($Y_{X/S}$) è stato calcolato essere 0.8, mentre il coefficiente di resa lipidi/biomassa ($Y_{L/X}$) e lipidi/substrato ($Y_{L/S}$) rispettivamente uguali a 0.126 e 0.125.

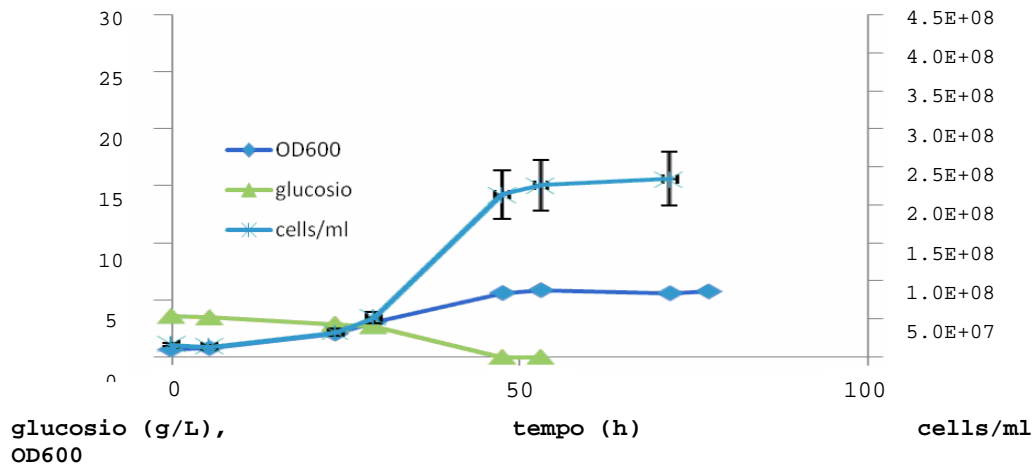


Fig.7. Cinetica di crescita di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 in terreno GMY contenente 4g/L di glucosio.

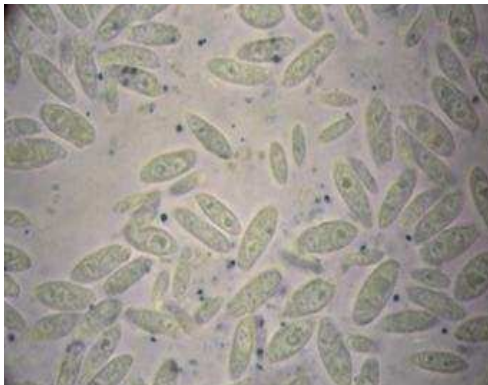


Fig.8. Cellule di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 in crescita in terreno GMY a basso C:N. Cellule fissate e colorate con Sudan Black B per identificare le lipid particles (in blu).

Crescita su terreno GMY ad alto C:N

La coltura contenente 30 g/L di glucosio è cresciuta con una velocità specifica di crescita di 0.041 h^{-1} . La coltura è entrata in fase stazionaria (determinata sulla base della concentrazione stazionaria del numero di cellule) a 72h dall'inoculo, quando erano presenti $2.5 \cdot 10^8$ cells/ml, il peso secco era 6.8 g/L ed erano ancora disponibili circa 20 g/l di glucosio. Dopo le 72 h, si è avuta progressiva diminuzione della concentrazione di glucosio che è stato esaurito dopo 167h. Nonostante questa fase sia stata caratterizzata dall'aumento del peso secco (fino a 12.7 g/L) e della torbidità della coltura (fino a 28.9), non si è osservato un significativo aumento della concentrazione cellulare ($3.1 \cdot 10^8$ cells/ml) (figura 9). Dopo 167 h, il coefficiente $Y_{X/S}$ era complessivamente pari a 0.39, mentre i coefficienti $Y_{L/X}$ e $Y_{L/S}$ erano rispettivamente 0.44 e 0.19.

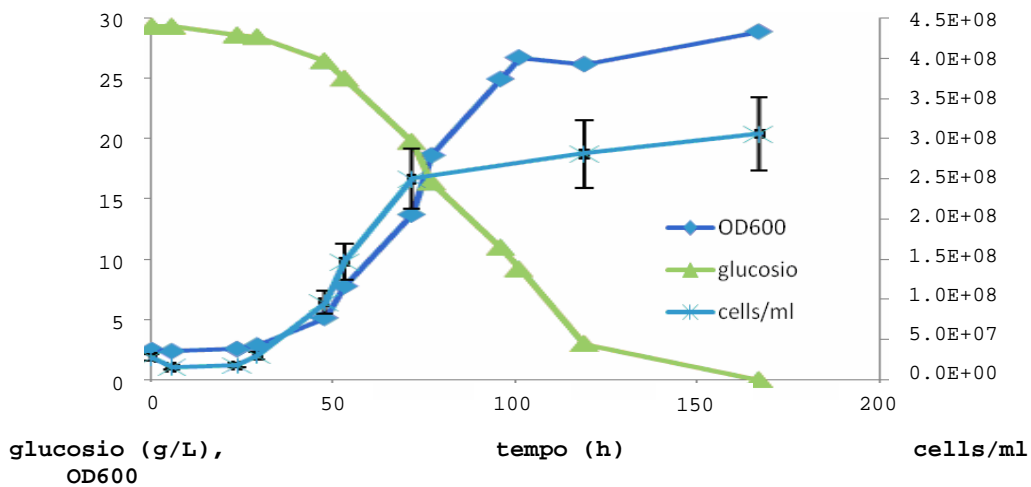


Fig.9. Cinetica di crescita di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 in terreno GMY contenente 30g/L di glucosio.

Coerentemente con il maggiore coefficiente $Y_{L/X}$, l'accumulo di *lipid particles* all'interno delle cellule appariva evidente anche all'esame microscopico (figura 10).

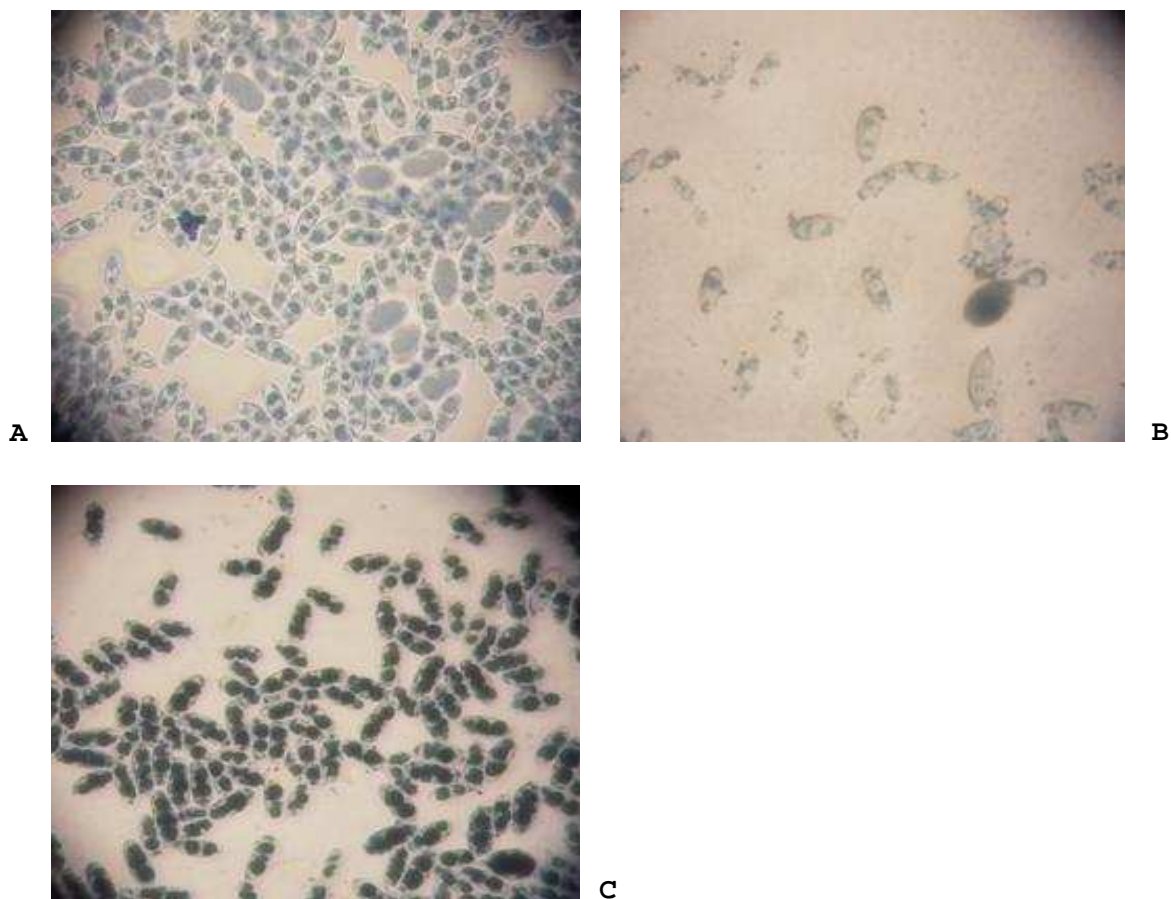


Fig.10. Cellule di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 in crescita in terreno GMY ad alto C:N dopo 48 h (A), 72 h (B) e 100 h (C). Cellule fissate e colorate con Sudan Black B per l'identificazione delle lipid particles.

Colture batch di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 a diverse temperature: cinetica di crescita, accumulo dei lipidi e profilo degli acidi grassi

Al fine di valutare gli effetti della temperatura sulla cinetica di crescita e sull'accumulo dei lipidi di *R. glacialis* DBVPG 4785, il ceppo è stato coltivato in bioreattore in terreno definito GMY contenente 40 g/L di glucosio, corrispondenti ad un rapporto C:N di 52:1, alle temperature di -3, 0, 5, 10, 15, 20 e 25°C.

Non si è verificata crescita alcuna quando la temperatura è stata fissata a 25°C, tuttavia *R. glacialis* 4785 è cresciuto abbondantemente a tutti gli altri valori sperimentati seppur con cinetiche e tempi diversi. L'incremento del peso secco della coltura, intendendo con ciò riferire sulla durata del

processo fermentativo fino all'ingresso in fase stazionaria, si è protratto da un minimo di 68h a 15°C ad un massimo di 328h a -3°C ed è terminato, a prescindere dalla temperatura, in corrispondenza dell'esaurimento della fonte di carbonio (figura 11).

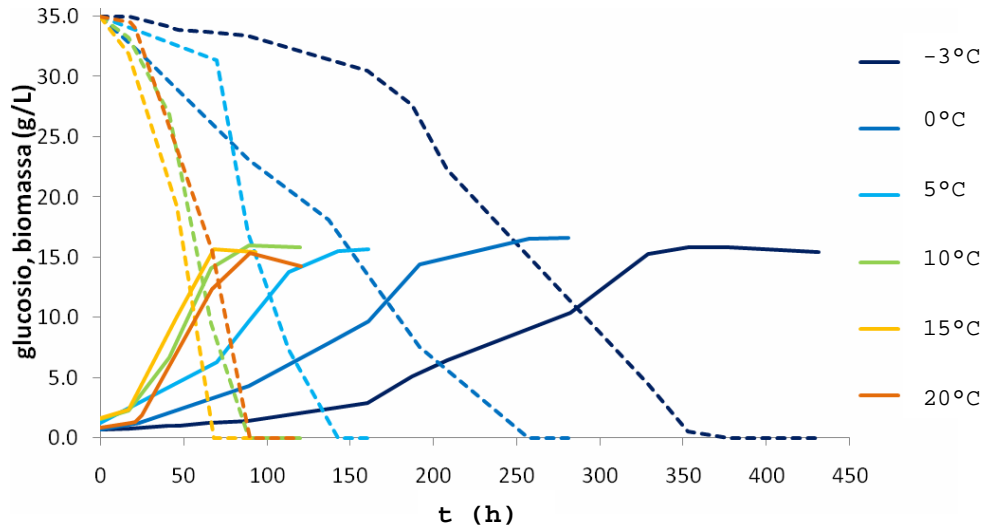


Fig.11. Curva di crescita (linea continua) e di consumo di glucosio (linea tratteggiata) di colture batch di *R. glacialis* DBVPG 4785 incubate a -3, 0, 5, 10, 15 e 20°C.

La velocità specifica di sviluppo (μ) è risultata più alta a 15°C (0.050 h^{-1}), quindi diminuisce con il diminuire della temperatura fino a 0.010 h^{-1} a -3°C (figura 12).

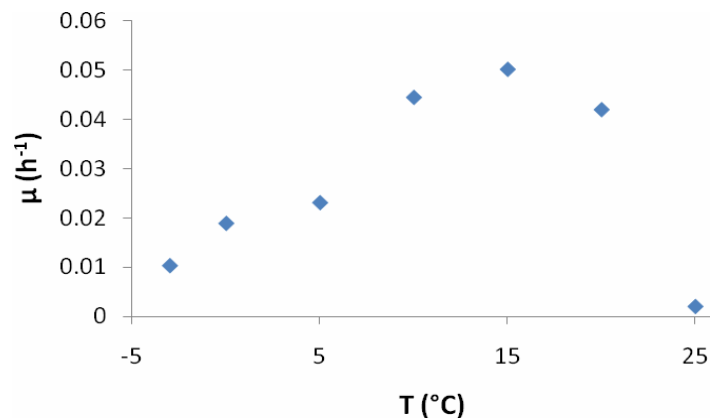


Fig.12. Effetto della temperatura di incubazione sulla velocità specifica di crescita di *R. glacialis* DBVPG 4785 in terreno GMY.

A differenza di quanto è stato osservato per la μ la resa in biomassa ($Y_{X/S}$) è risultata pressoché la stessa a tutte le temperature, infatti, a fine crescita il coefficiente $Y_{X/S}$ manifesta valori compresi tra 0.40 e 0.45 (tabella 5) mentre il peso della biomassa liofilizzata varia da 15.5 a 16.6 g/L, evidentemente senza differenze significative. Il coefficiente $Y_{L/X}$ è stato misurato fra un minimo di 0.50 e un massimo di 0.67, mentre il coefficiente $Y_{L/S}$ si sposta da 0.22 a 0.28, ciò nonostante per nessuno dei due rapporti di resa è stato possibile ipotizzare un effetto esatto della temperatura sulla capacità della cellula di produrre e di accumulare lipidi (tabella 5).

T	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$	$Y_{X/S}$	$Y_{L/X}$	$Y_{L/S}$
-3	0.010	0.43	0.50	0.22
0	0.019	0.45	0.55	0.25
5	0.023	0.41	0.67	0.28
10	0.045	0.41	0.59	0.24
15	0.050	0.40	0.65	0.26
20	0.042	0.041	0.57	0.25

Tab.5. Velocità specifica di crescita (μ_{\max}), coefficiente di resa biomassa/substrato ($Y_{X/S}$) (w/w), lipidi/biomassa ($Y_{L/X}$) (w/w) e lipidi/substrato ($Y_{L/S}$) (w/w) di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 in terreno GMY a -3, 0, 5, 10, 15 e 20°C.

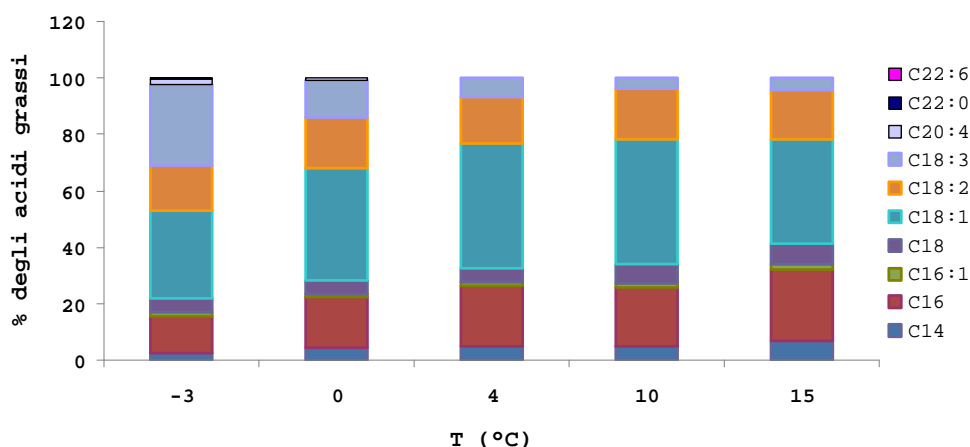
Composizione della frazione lipidica recuperata da *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 a diverse temperature

La composizione degli acidi grassi presenti nelle frazioni lipidiche recuperate a fine fermentazione è stata determinata mediante analisi effettuate con lo strumento GC-MS. Nei campioni analizzati di *R. glacialis* DBVPG 4785, a prescindere dalla temperatura, sono sempre stati riconosciuti gli acidi grassi: C10, C11, C12, C14, C16, C16:1, C18, C18:1, C18:2, C18:3, C20, C20:1, C22, C24. 7 di questi, da soli, rappresentano circa il 99% degli acidi grassi totali recuperati. Si tratta di quelli che hanno una lunghezza di

catena che va dai 14 ai 18 atomi di C, possono essere sia saturi che insaturi fino a 3 insaturazioni. Sebbene presenti in percentuali meno importanti, gli acidi grassi C20:4, C22:0 e C22:6 sono stati comunque considerati per l'alto valore nutraceutico che è loro riconosciuto e per evidenziare il fatto che sono prodotti dal ceppo di *R. glacialis* in esame solo alle più basse temperature sperimentate.

Infine, calcolato sulla base della concentrazione relativa degli acidi grassi, un indice di insaturazione (UI) che riferisce sul grado di insaturazione delle frazioni lipidiche estratte, è stato assegnato al microrganismo per ogni valore di temperatura (tab. 6 e fig. 11) quindi, sono stati confrontati fra loro.

T	C14	C16	C16:1	C18	C18:1	C18:2	C18:3	C20:4	C22:0	C22:6	UI
-3	2,2	13,3	1,3	5,0	31,1	16,2	28,3	2,4	0,1	0,2	1,59
0	4,3	18,2	1,0	4,7	39,7	18,2	12,9	0,9	-	-	1,19
5	4,7	21,7	1,1	4,8	44,4	16,7	6,6	-	-	-	0,99
10	4,7	21,1	1,6	6,7	44,3	17,7	3,8	-	-	-	0,93
15	6,9	24,9	2,1	7,5	37,0	17,2	4,4	-	-	-	0,87



Tab.6 e Fig. 13. Composizione relativa (%) degli acidi grassi e indice di insaturazione (UI) di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 in fase stazionaria dopo crescita in terreno GMY a -3, 0, 5, 10, 15°C.

Si osserva che, al diminuire della temperatura, la misura dell'insaturazione degli acidi grassi aumenta progressivamente, salendo da 0.87 a 15°C fino a 1.59 a -3°C; comportamento questo, dovuto principalmente all'incremento nel contenuto di acido linolenico (C18:3) prodotto in concentrazione crescente passando dai 15 (4.4%) ai -3°C (oltre il 28%). Al contrario, il contenuto relativo di acido oleico (C18:1) sembrerebbe ridursi a -3°C quando, a partire da una concentrazione relativa di circa il 44% diventa uguale al 31.1%. Infine, si nota che l'acido linoleico (C18:2) resta pressoché invariato, mediamente intorno al 17%, nonostante il variare invece della temperatura.

Tutto quanto è stato appena detto si traduce poi, sostanzialmente, in un allungamento della lunghezza media delle catene degli acidi grassi mano a mano che la temperatura cui il ceppo è coltivato viene diminuita: gli acidi grassi C16 e C18 rappresentano rispettivamente il 27 e 66% del totale recuperato a 15°C, diventando il 15 e l'81% a -3°C (figura 14).

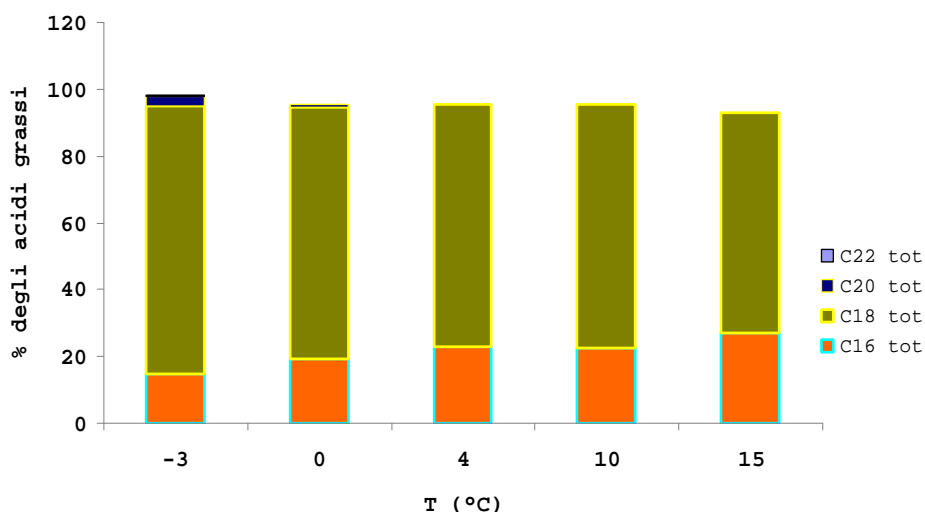


Fig.14. Composizione relativa (%) degli acidi grassi C16, C18, C20 e C22 totali presenti negli estratti lipidici di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 in fase stazionaria dopo crescita in terreno GMY a -3, 0, 5, 10, 15°C.

La fermentazione batch di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 a -3°C

Dei processi di fermentazione messi a punto sul ceppo di *R. glacialis* alle diverse temperature, il più interessante è senza dubbio quello che è stato seguito al limite dei -3°C. Interessante dal momento che, fino ad oggi, i lavori che riportano di fermentazioni condotte a temperature inferiori, o anche prossime, a 0°C sono praticamente assenti.

La cinetica di sviluppo del microrganismo a -3°C è stata già osservata nel paragrafo precedente dove è stata anche confrontata con quelle osservate a temperature superiori.

Ad intervalli prestabiliti durante il processo fermentativo, in particolare durante la fase di crescita esponenziale e in stazionaria, sono state prelevate aliquote di brodo colturale dal bioreattore ed analizzate per osservare se e come variavano nel tempo, sia l'accumulo dei lipidi nella cellula microbica che la composizione relativa degli acidi grassi nelle frazioni estratte di volta in volta.

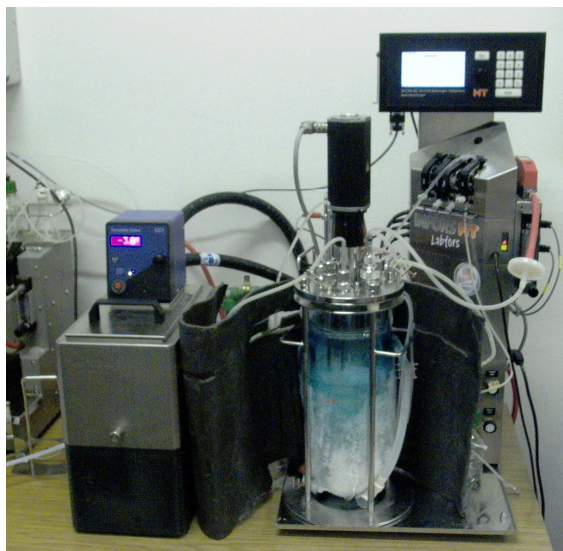


Fig. 15. Foto del bioreattore della la prova di fermentazione di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 a -3°C.

Dopo deplezione della fonte di carbonio il microrganismo entra in fase stazionaria. L'accumulo dei lipidi, localizzato nelle particles lipids della cellula, avviene progressivamente dall'inizio dell'esponenziale fino all'ingresso in

stazionaria, dove, si mantiene costante. E' evidente che a questo punto del processo, tarda fase logaritmica di sviluppo e inizio stazionaria, si realizza il massimo accumulo di lipidi nella cellula.

Nelle figure successive è riportata l'informazione riguardo ai lipidi totali (g/L) che di volta in volta sono stati estratti dalla cellula microbica in funzione del tempo di fermentazione.

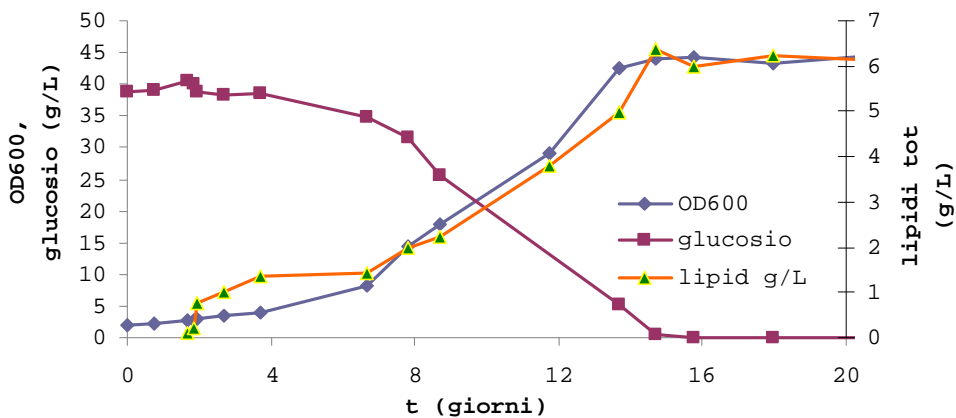


Fig.16. Curva di crescita di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785, consumo di glucosio e andamento dell'accumulo dei lipidi nelle cellule coltivate in terreno MGY a -3°C in bioreattore.

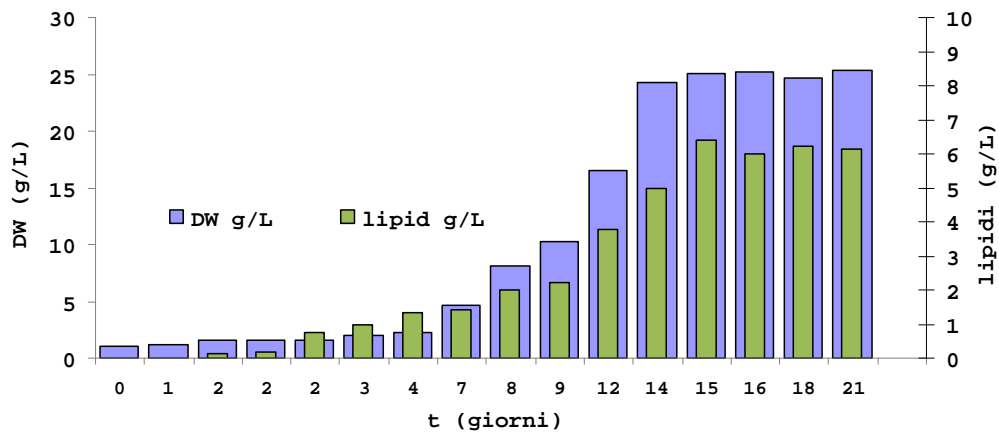


Fig.17. Crescita della biomassa liofilizzata di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 e lipidi totali (g/L) estratti dal lievito a tempi diversi durante la fermentazione a -3°C in bioreattore.

L'analisi dei cromatogrammi di ogni singola frazione estratta ha rivelato che unitamente al progressivo accumularsi dei lipidi nella cellula, si verifica anche un incremento significativo della componente insatura degli acidi grassi che, sostanzialmente, si realizza a spese di quella satura che invece diminuisce con altrettanta coerenza fino all'ingresso in stazionaria del lievito.

Tale comportamento si riflette sull'indice di insaturazione che aumenta durante tutta la fase logaritmica di crescita passando da 0.82, a 4 giorni dall'inoculo quando vi è l'ingresso in esponenziale, a 1.61 a 15 giorni, ovvero, tarda fase esponenziale di crescita (tabella 7). Nello stesso intervallo di tempo si osserva quasi un dimezzamento nel contenuto percentuale di C16 totali, saturi ed insaturi, e contemporaneamente un aumento significativo in concentrazione relativa di C18 totali che da circa il 67% arrivano a fine fase logaritmica di crescita a rappresentare gli acidi grassi totali recuperati per più dell'80%.

Quanto detto suggerisce quindi che a fine fase logaritmica si verifica, per lo psicrofilo obbligato in studio, il massimo accumulo di lipidi nella cellula, specificamente nelle particelle lipidiche, nello stesso tempo si ottiene anche il massimo grado di insaturazione dagli acidi grassi estratti.

In altri termini la tarda fase esponenziale di crescita si può considerare il punto in cui si ha la massima frazione possibile recuperabile di acidi grassi polinsaturi.

T (giorni)	4	7	9	12	15	18	21
UI	0,82	1,19	1,48	1,58	1,61	1,57	1,61
C16 tot	29,56	25,80	22,82	17,00	15,96	14,65	15,69
C18 tot	67,32	70,81	75,26	81,00	80,57	82,56	81,31

Tab.7. Indice di insaturazione (UI) e contenuto relativo degli acidi grassi C16 totali e C18 totali recuperati a tempi diversi dalla fermentazione di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 a -3°C.

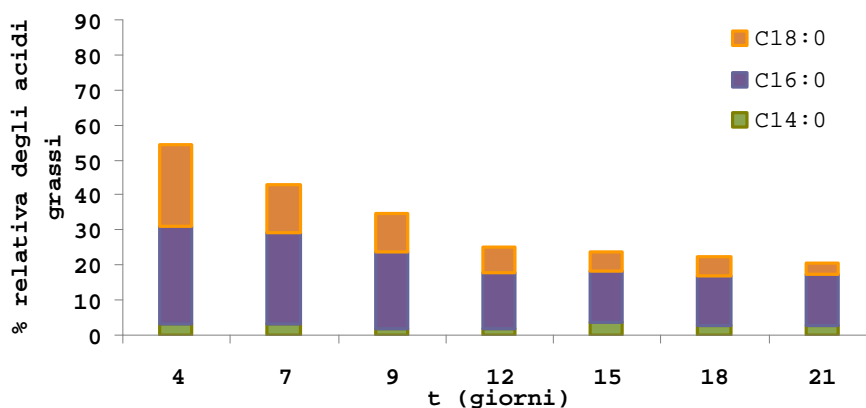


Fig.18. Progressivo calo della frazione satura degli acidi grassi recuperati durante la fase esponenziale di crescita di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 in bioreattore a -3°C .

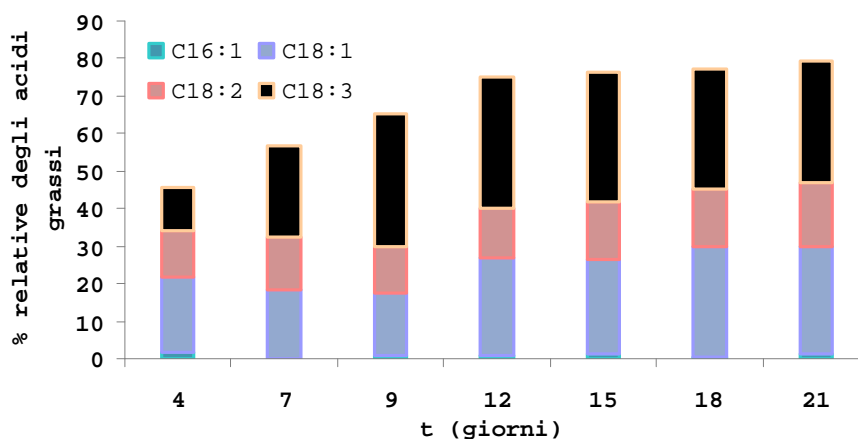


Fig.19. Aumento progressivo della frazione insatura degli acidi grassi recuperati durante la fase esponenziale di crescita di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 in bioreattore a -3°C .

Prove di fermentazione in bioreattore di *Schizochytrium limacinum* SR-21

Il microfungo *Schizochytrium limacinum* SR-21 è ad oggi, fra i microrganismi più utilizzati per la sintesi industriale di lipidi microbici ad alto contenuto di acidi grassi polinsaturi. E' stato inserito nello studio per verificarne le caratteristiche produttive, per conoscere il modo in cui, nei microfunghi in genere, avviene l'accumulo dei lipidi evidenziando le differenze rispetto ai lieviti psicrofili, infine, perché fosse un utile riferimento per meglio valutare

le potenzialità applicative, in questo settore, dei lieviti psicrofili.

Cinetica di sviluppo

Effettuando prelievi di campione a tempi diversi, dopo l'inoculo che da inizio al processo fermentativo, è stata definita la curva di crescita di *Schizochytrium limacinum* SR-21 basandosi sulla variazione nel tempo della torbidità della coltura e contemporaneamente avvalorando i risultati attraverso l'osservazione dell'incremento del peso secco della biomassa.

In prove preliminari di fermentazione avevamo confrontato le cinetiche di crescita del microorganismo su terreni aventi concentrazioni diverse di carboidrato. Ogni prova conservava sempre lo stesso rapporto C/N, (già ottimizzato da studi ampiamente documentati). Queste prove avevano decretato quale ottimale la condizione in cui il microorganismo cresceva nel terreno più "ricco" in fonte di carbonio, quando i valori finali conseguiti in peso di biomassa e lipidi totali erano i più alti possibili. Inoltre si osservava che il rapporto fra questi risultati e quelli ottenuti da terreni più poveri in disponibilità di carboidrato rispecchiava sempre la proporzione stabilita inizialmente fra le concentrazioni di glucosio; per esempio era pari a 1:10 se i terreni avevano rispettivamente 6 e 60 g/L di glucosio.

In terreno ricco la fase esponenziale di crescita inizia dopo circa 30 ore di lag e si presenta con un aumento deciso di OD e del peso secco della coltura. L'incremento è costante fino a fine fase esponenziale, quando si conseguono i valori finali di 25,3 e di circa 16 g/L di biomassa secca, rispettivamente. Nello stesso tempo, la diminuzione della concentrazione di glucosio nel terreno di coltura è progressiva e, totale, a fine fase logaritmica. Il pH della coltura, pure costantemente monitorato durante tutta la durata del processo fermentativo, resta pressoché invariato, oscillando intorno a valori di neutralità. Alla luce di quanto detto, è plausibile ritenere

che il microfungo in studio, come osservato anche per i lieviti, entri in stazionaria per deplezione della fonte di carbonio. La temperatura di crescita ottimale del microfungo è di 25°C.

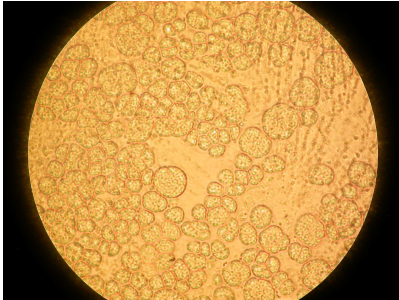


Fig.20. Cellule in proliferazione di *Schizochytrium limacinum* SR-21 osservate al microscopio Nikon Eclipse E-600 (Nikon, HBO, 100W).

Misurata in condizioni ideali la μ_{\max} di crescita è pari a 0.051 h^{-1} , mentre i coefficienti di resa in biomassa ($Y_{X/S}$) e lipidi totali ($Y_{L/S}$) per consumo di substrato, a fine fase esponenziale, si presentano rispettivamente uguali a 0.330 e 0.120. Così come accade per i lieviti, la frazione di olio microbico della cellula aumenta durante l'intera fase di sviluppo logaritmico ($Y_{L/X}$ circa uguale a 0.4) e lo stesso succede per quella parte di lipidi che si compone di acidi grassi polinsaturi.

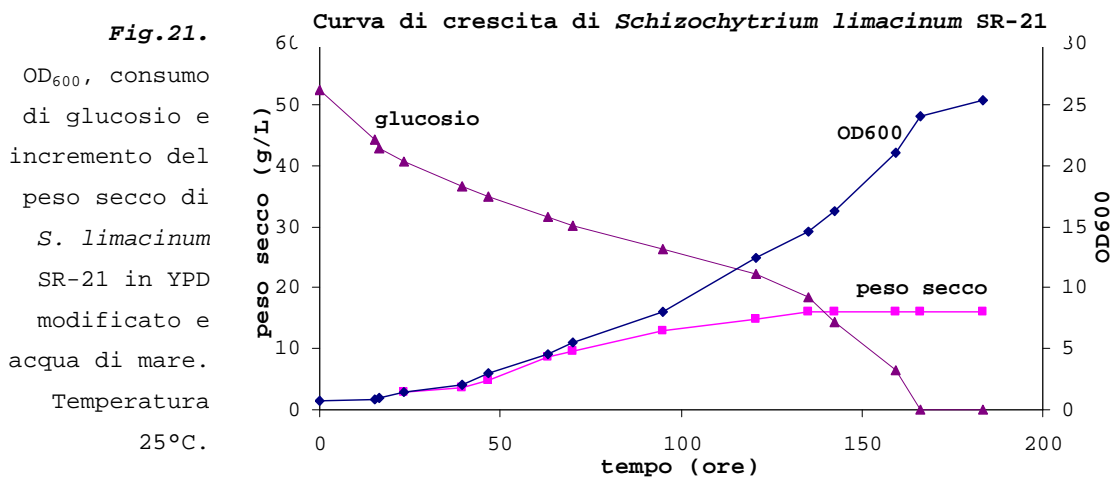
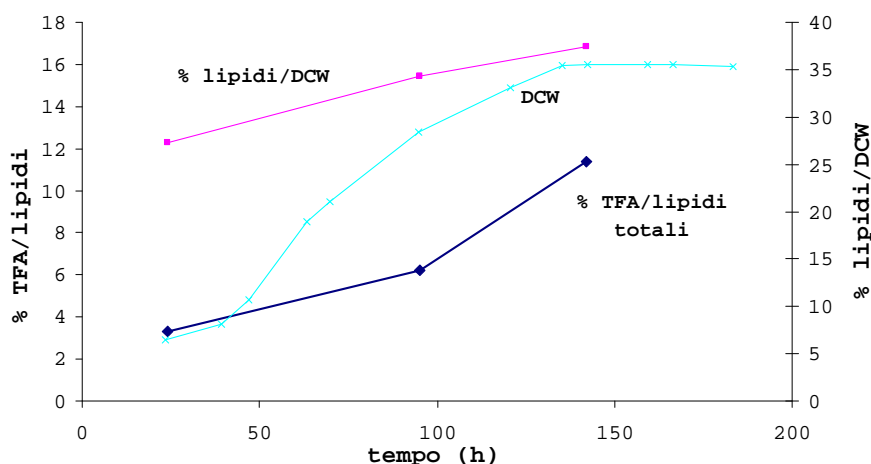


Fig. 22. Andamento del rapporto lipidi totali/DW;
acidi grassi totali (TFA)/lipidi totali;
incremento della biomassa secca (DW)

di *S. limacinum*
SR-21 in
bioreattore.



L'analisi degli acidi grassi componenti i lipidi recuperati dalla biomassa liofilizzata, è stata eseguita ad intervalli di tempo prestabiliti lungo il processo, ovvero a 24, 95 e 142 ore dall'inoculo, tempi corrispondenti ad inizio, piena e fine fase esponenziale di crescita. L'esame gas cromatografico delle frazioni estratte ha rivelato la presenza di acidi grassi a lunga catena e ad alto grado di insaturazione, quali il C20:4,n-6 (ARA) il C22:5,n-3 (EPA) e soprattutto il C22:6,n-3 (DHA). Questi PUFA sono stati rilevati solo dopo 95 ore di processo, ovvero da piena fase logaritmica di sviluppo e, fino all'ingresso in stazionaria (142 ore), arricchiscono sempre di più la componente grassa del microfungo (tabella 8). Di seguito, vengono proposti i due profili di composizione delle frazioni lipidiche recuperate dal microfungo coltivato su terreni con diversa concentrazione di carboidrato, rispettivamente povero, con 6g/L, e ricco con 60g/L. L'intenzione è evidenziare quanto importante sia decidere sulla disponibilità di carboidrato in una prova di fermentazione, poiché, condiziona in modo marcato il profilo lipidico del microrganismo, sia nel tipo di acidi grassi che in quantità accumulata (tab. 8 e fig. 23). Focalizzando l'attenzione solo sugli acidi grassi di maggiore interesse, l' α -ALA, l'EPA e il DHA, questi sono prodotti e accumulati

nella cellula del microfungo solo quando il terreno dispone di carboidrato in eccesso (figura 24).

Infine, chiaramente, il contenuto relativo di ogni acido grasso si ridefinisce, aumenta o diminuisce, in funzione dell'età della coltura ossia, del momento in cui la prova di fermentazione è valutata.

terreno	tempo (ore)	C14:0 C15:0 C16:0 C17:0 C18:0 C18:1 C18:2 C18:3 C20:0 C20:4 C20:5 C22:6											
		24	3,59	4,41	48,60		19,39	8,21	15,80				
povero	95	3,59	4,65	45,12	0,86	13,79	13,28	13,61			0,85		4,25
	142	0,63	0,89	31,93	0,33	15,41	27,18	21,40		0,52			1,72
ricco	24		1,17	32,55	0,44	18,71	21,80	22,45					2,88
	95	1,21	15,53	19,89	2,47	6,85	12,20	21,36	3,40	0,20		12,39	2,38
	142	1,08	21,72	16,13	2,40	6,62	11,34	16,74	1,16			17,65	2,97

Tab.8. Acidi grassi che compongono le frazioni lipidiche recuperate da *S. limacinum* SR-21 coltivato su YPD modificato e acqua di mare con diverso contenuto di carboidrato: povero con 6g/L e ricco con 60g/L. Analisi in tre tempi diversi del processo fermentativo in bioreattore.

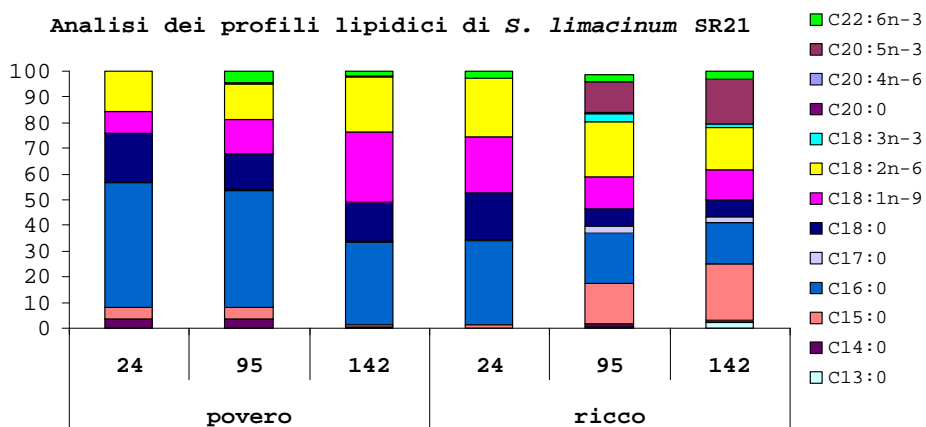


Fig.23. Composizione in acidi grassi delle frazioni lipidiche recuperate a 3 tempi diversi durante il processo fermentativo di *S. limacinum* SR-21, coltivato su terreni diversi in contenuto di glucosio, 6 o 60g/L rispettivamente terreno povero e ricco.

**Omega-3 polinsaturi recuperati da *Schizochytrium limacinum*
SR-21**

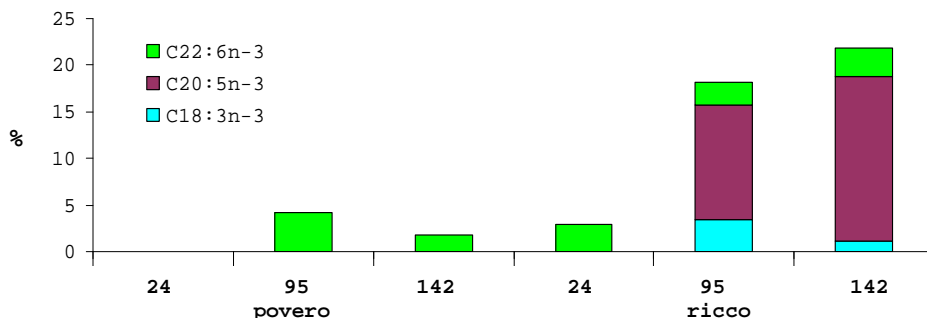


Fig.24. Variazione nel tempo delle percentuali recuperate di α -ALA (C18:3, n-3), EPA (C20:5,n-3) e DHA (C22:6,n-3) dal microfungo *S. limacinum* SR-21 coltivato in terreno povero e ricco di fonte di carbonio.

Parte terza: Nile Red e misure di fotofisica

Misure relative agli standard lipidici

Come già detto nel capitolo dedicato ai materiali e ai metodi impiegati in questo lavoro, come standard lipidici per le misure da effettuare in fluorescenza sono stati strategicamente scelti l'acido stearico (C18:0), il linoleico (C18:2), l'acido α -linolenico (C18:3) e il fosfolipide α -fosfatidilcolina.

Di ciascuno standard, a partire dalla rispettiva soluzione stock (vedi materiali e metodi) sono state preparate 6 diverse soluzioni a diverse concentrazioni, contenenti 5, 10, 20, 30, 40 e 50 μ l di stock.

Delle soluzioni di standard e dei rispettivi bianchi sono stati registrati gli spettri di assorbimento e gli spettri di emissione in *FF* eccitando a 488 nm (*figura 25*).

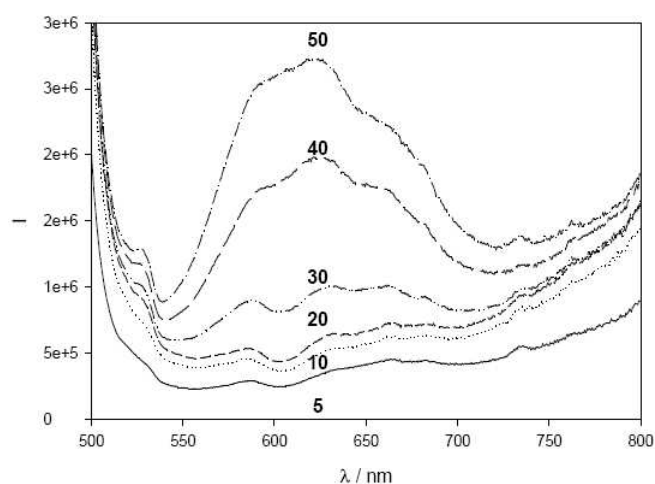


Fig.25. Esempio di uno spettro di emissione in *FF* dei vari campioni di acido stearico; eccitazione a 488nm.

Sono stati inoltre registrati gli spettri di eccitazione in *RA* a 660nm.

Plottando ogni volta l'intensità di emissione a varie lunghezze d'onda in funzione del volume di standard aggiunto si ottiene l'andamento dei due parametri messi in relazione. I dati di emissione sono ottenuti sottraendo sempre allo spettro di emissione dei campioni lo spettro di emissione dei rispettivi bianchi. Nella maggior parte dei casi l'andamento si è rivelato lineare tranne che per l'acido stearico, in relazione al quale sono state tracciate due rette dall'interpolazione dei dati sperimentali; l'ascissa di intersezione rivela il volume di acido stearico che corrisponde alla sua *cmc* (concentrazione critica micellare), (circa 26 μ l) (figura 26). In questo caso bisogna assicurarsi di preparare campioni di standard che siano sopra la *cmc* in modo da essere sicuri della presenza di micelle. Per la maggior parte dei lipidi le *cmc* sono nell'ordine del mM e quindi vanno preparate soluzioni standard a concentrazione almeno pari a 10^{-2} M.

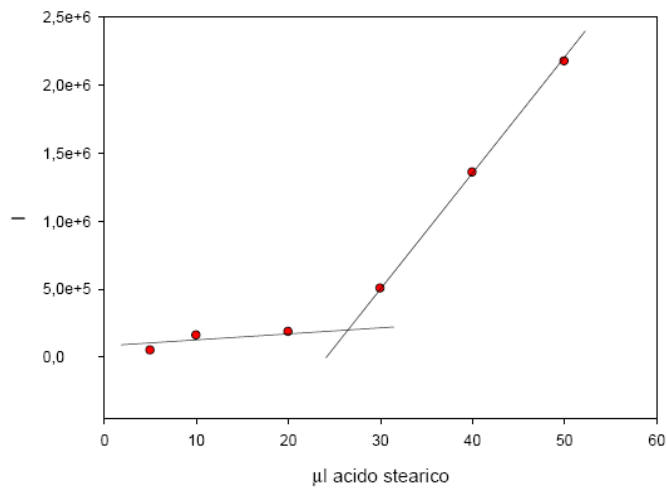


Fig. 26. Andamento dell'emissione di fluorescenza in funzione del volume di acido stearico contenuto, $\lambda = 586$ nm (massimo di emissione).

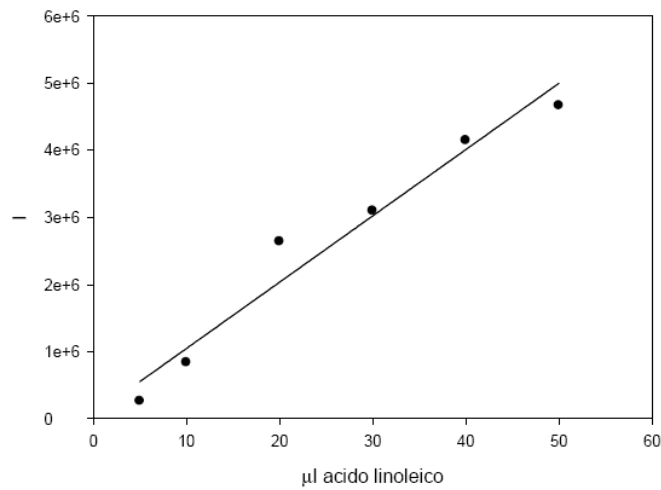


Fig. 27. Andamento dell'emissione di fluorescenza in funzione del volume di acido linoleico contenuto, $\lambda = 630$ nm (massimo di emissione), ($R=0.9795$).

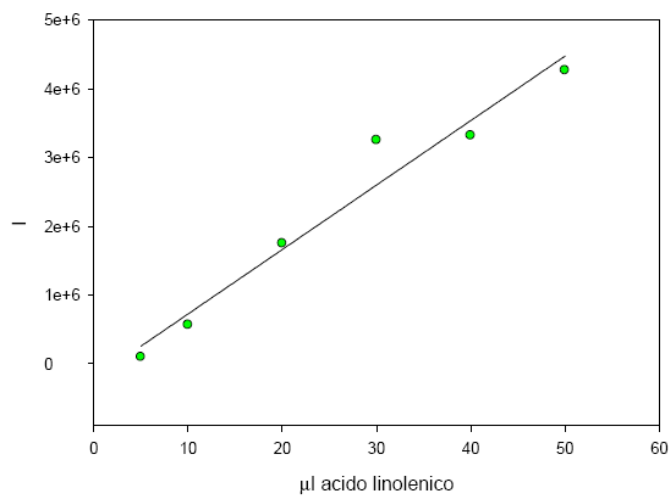


Fig. 28. Andamento dell'emissione di fluorescenza in funzione del volume di acido α -linolenico contenuto, $\lambda = 631$ nm (massimo in emissione), ($R=0.9792$).

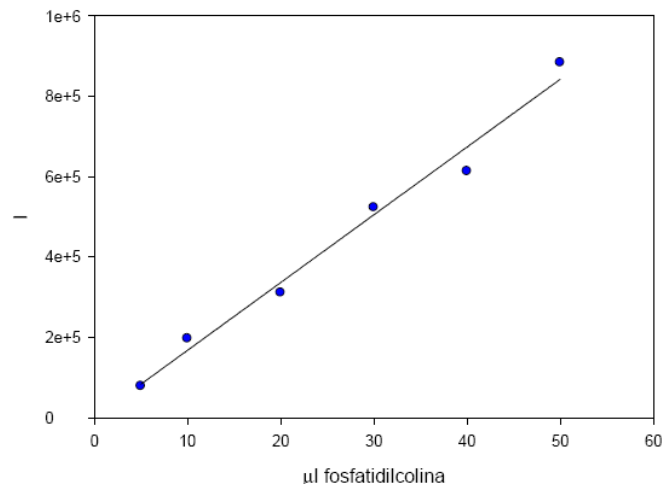


Fig.29. Andamento dell'emissione di fluorescenza in funzione del volume di fosfatidilcolina contenuto, $\lambda = 637$ nm (massimo in emissione), ($R=0.9918$).

Sono infine state eseguite misure con volumi crescenti di Nile Red aggiunti a soluzioni contenenti 100 μ l ciascuna di soluzione di standard, quindi, sono stati di volta in volta riportati gli andamenti dell'intensità di emissione in funzione del volume di soluzione di Nile Red aggiunto. Le prove effettuate con acido stearico e acido linoleico, hanno entrambe suggerito l'esistenza di una concentrazione massima di Nile Red cui corrisponde il massimo di emissione da parte della soluzione contenente l'uno o l'altro standard ad una data concentrazione (pari a 30 μ l di Nile Red in entrambi i casi) (*figure 30 e 31*). Ne consegue che la quantità di colorante massima da utilizzare per il nostro sistema è di 30 μ l di soluzione di Nile Red. È chiaro come l'aumento del colorante aumenti l'intensità di emissione dei campioni e di conseguenza aumenti la sensibilità del metodo.

Nei casi invece dell'acido linolenico e del fosfolipide fosfatidilcolina, tale massima concentrazione della sonda fluorescente non è stata individuata, si è sempre osservato invece un incremento in tale intensità dipendente dai volumi aggiunti di Nile Red (*figure 32 e 33*).

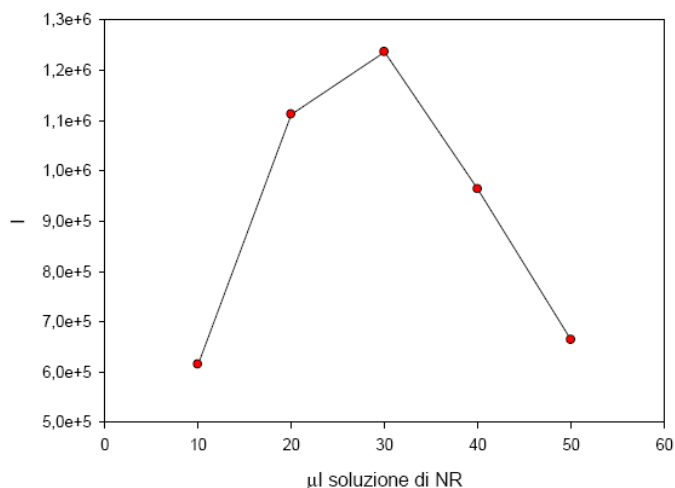


Fig.30. Andamento dell'intensità di emissione a 608 nm della soluzione con 100 µl di acido stearico in funzione del volume di soluzione di Nile Red aggiunto.

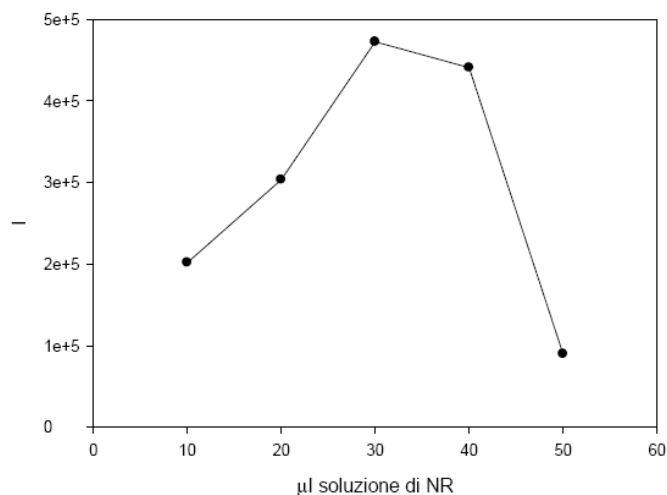


Fig.31. Andamento dell'intensità di emissione a 630 nm della soluzione con 100 µl di acido linoleico in funzione del volume di soluzione di Nile Red aggiunto.

Nel caso della fosfatidilcolina, infine, sono stati acquisiti anche gli spettri di anisotropia in stato stazionario in modalità di *FF* e in *RA* (dati sperimentali non riportati). I risultati in *FF* come era prevedibile hanno dato valori più uniformi rispetto a quelli ottenuti in *RA* e quindi di più facile interpretazione.

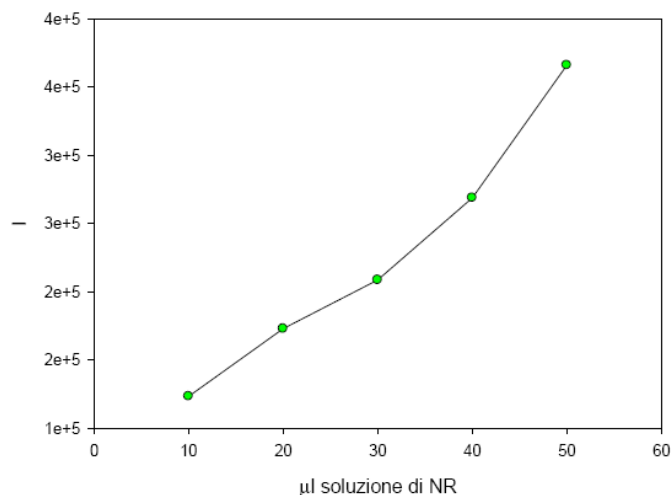


Fig.32. Andamento dell'intensità di emissione a 622 nm della soluzione con 100 µl di acido linoleico in funzione del volume di soluzione di Nile Red aggiunto.

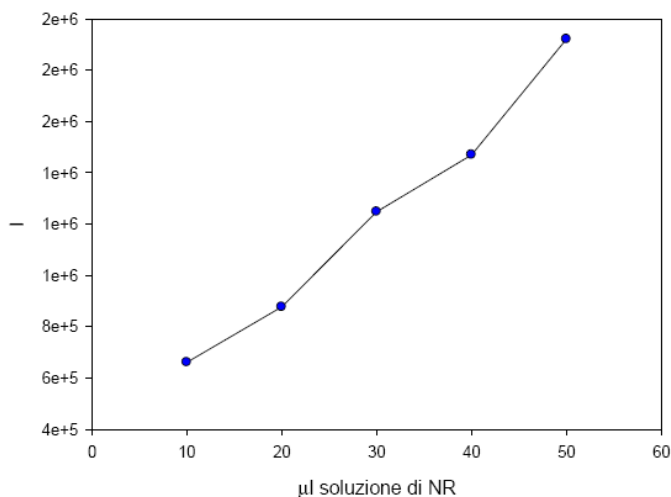


Fig.33. Andamento dell'intensità di emissione a 614 nm della soluzione con 100 µl di acido linoleico in funzione del volume di soluzione di Nile Red aggiunto.

Caratterizzazione degli standard lipidici

Lo studio a questo punto ha voluto effettuare misure di anisotropia di emissione in RA alla lunghezza d'onda massima di emissione relativa e calcolare le rese quantiche per ciascuno standard lipidico (acido stearico, linoleico, α -linolenico e fosfatidilcolina), differenziando le misure per concentrazioni di standard. Si tratta di dati alquanto complessi che non sono stati riportati nello specifico in questo documento. Tuttavia, vale la pena riportare quanto è

stato concluso da queste misure, ovvero che i valori di anisotropia di emissione non possono venire utilizzati come proprietà per distinguere fra un lipide e l'altro poiché sono tutti molto simili fra loro.

Sono pure state effettuate misure sui tempi di vita dei campioni lipidici studiati (dati non riportati in questa sede).

Mettendo in grafico i tempi di vita ottenuti per campioni contenenti le stesse quantità di lipidi differenti e quindi con diversa polarità, si ottengono gli andamenti estremamente interessanti mostrati in *figura 34*.

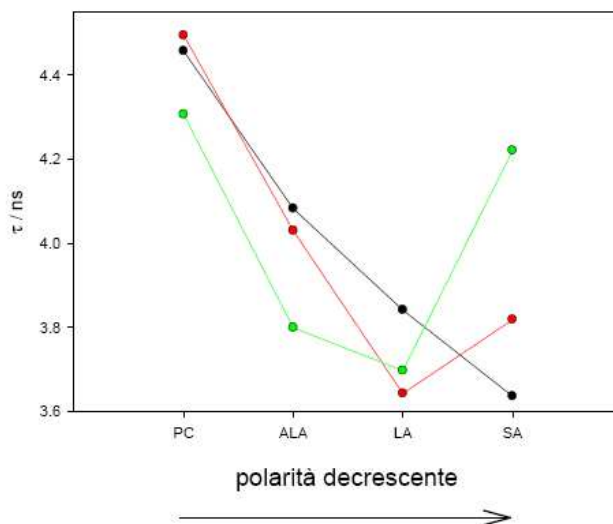


Fig.34. Andamenti dei tempi di vita in funzione della polarità del lipide (PC: fosfatidilcolina, ALA: acido α -linolenico, LA: acido linoleico, SA: acido stearico); le linee collegano campioni contenenti stessi volumi di differenti standard: la linea nera si riferisce ai campioni contenenti 20 μ l di soluzione standard, la rossa a quelli con 80 μ l e la verde a quelli con 320 μ l.

E' evidente che questa è una proprietà fotofisica che può essere utilizzata per distinguere un tipo di lipide da un altro. Dai dati ottenuti si può vedere che lipidi polari come la fosfatidilcolina danno tempi di vita più lunghi e di conseguenza rese quantiche maggiori rispetto ai lipidi neutri. Inoltre si manifesta una crescente diminuzione del tempo di

vita passando dall'ALA, il più polare dei lipidi neutri, all'SA, il più apolare del gruppo.

Infine vengono riportati in due grafici riassuntivi i dati di intensità di emissione contro i microlitri di standard lipidico presenti nei campioni analizzati e gli andamenti dei massimi di emissione in funzione della polarità dei lipidi.

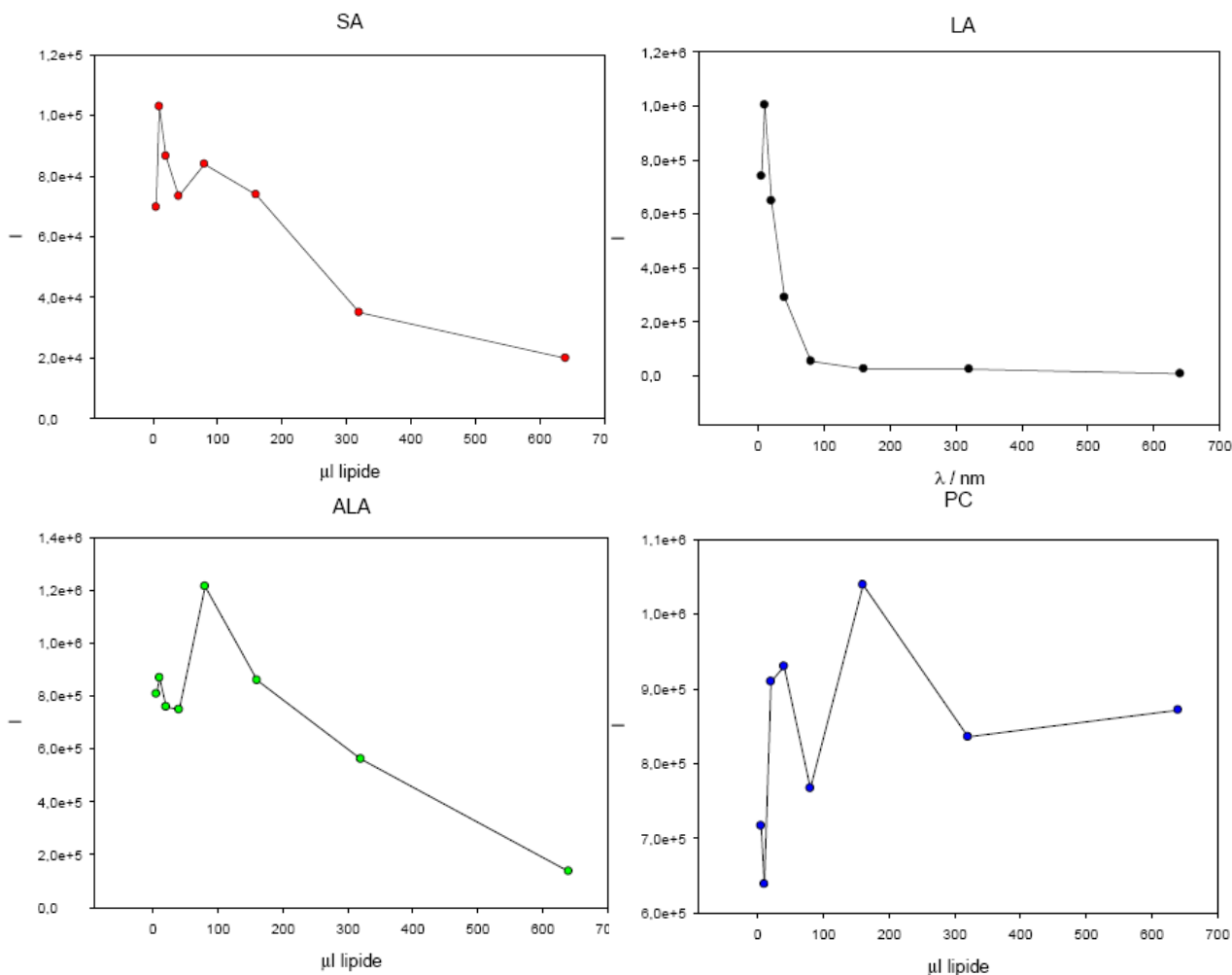
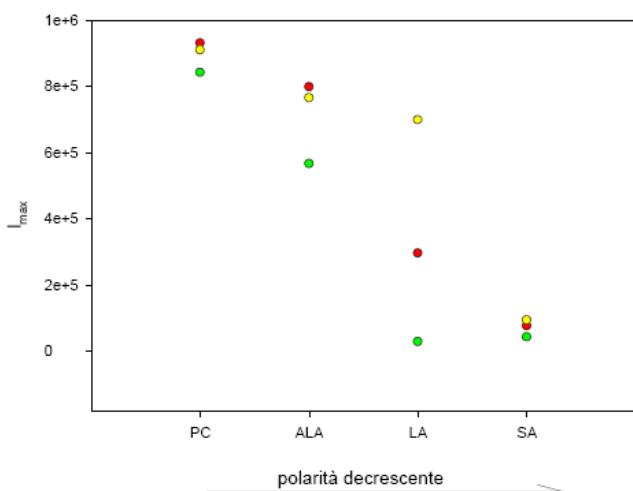


Fig. 35. Andamenti delle emissioni di fluorescenza a 610 nm in funzione del volume di soluzione standard contenuto nei campioni esaminati.

E' ovvio che l'intensità di emissione massima varia con la concentrazione dello standard e in un modo dipendente dalla sua stessa natura.

Se si combinano le misure delle quattro prove allora il risultato netto è il grafico successivo.

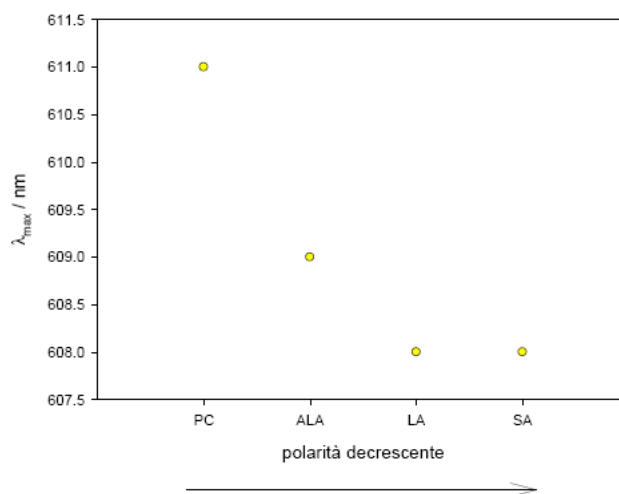
Fig.36. Il grafico mostra il massimo di emissione di ciascun lipide a



a differenti concentrazioni in funzione della sua polarità; in giallo, rosso e verde sono riportati i dati dei campioni contenenti rispettivamente 20, 40 e 320 µl di soluzione standard.

Infine sono stati riportati in figura 35 i valori di lunghezza d'onda corrispondenti al massimo di emissione della sonda in funzione della polarità del lipide.

Fig.37. In grafico sono riportati i valori di lunghezza d'onda cui si ha il massimo di emissione dei campioni lipidici, in funzione della polarità dei lipidi analizzati; i dati si riferiscono a campioni contenenti 320 µl di soluzione standard.



Misure sui campioni di lievito psicrofilo obbligato *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 e facoltativo *Cryptococcus gilvescens* DBVPG 4722.

Purtroppo la parte riguardante le misure sui campioni di lievito è ancora in itinere. Sin'ora sono stati ottenuti ancora pochi dati seppure incoraggianti; in questo documento ci limitiamo pertanto a riportare solo quanto fino a questo punto è stato raccolto ed esaminato.

Prove di fermentazione a 4°C sono state effettuate sul ceppo di lievito psicrofilo obbligato *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 e sul facoltativo *Cryptococcus gilvescens* DBVPG 4722. Conseguita la fase stazionaria, quando, come era stato verificato, la resa produttiva in biomassa e in lipidi è massima, sono stati effettuati prelievi da entrambe le colture destinandoli alle misure di fotofisica.

Sono state effettuate prove di misure di assorbimento e di emissione su due sospensioni cellulari preparate con 100 µl delle rispettive colture di uno o dell'altro dei due ceppi di lievito, 2 ml PBS e 10 µl di Nile Red (figura 38).

Di seguito, per semplicità, sono riportati prevalentemente i dati che riferiscono delle prove effettuate sul ceppo di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. I 100 µl di coltura di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 avevano una concentrazione di $3.0E10^7$ cellule in fase stazionaria.

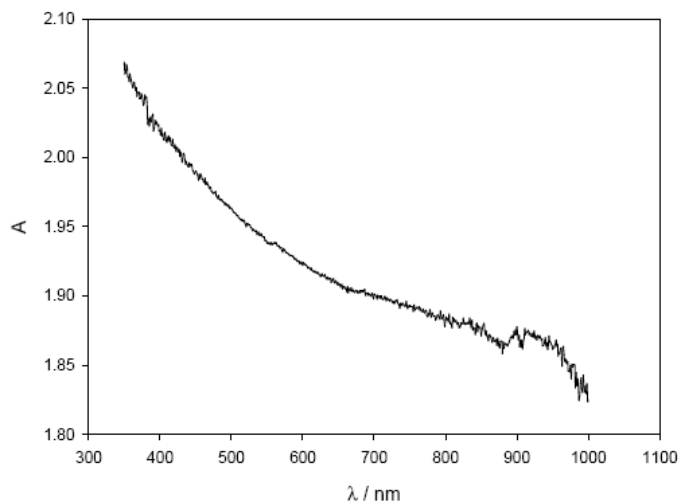


Fig.38. Spettro di assorbimento del ceppo di lievito psicrofilo *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785.

L'emissione è stata registrata subito dopo l'iniezione di Nile Red e dopo 5 minuti dall'aggiunta, tempi in cui l'efficienza di emissione di fluorescenza da parte della sonda è massima. La rivelazione lipidica con Nile Red, viene comunemente misurata con un'eccitazione di 488-490 nm, intervallo in cui cade il massimo di emissione della sonda quando interagisce

con lipidi neutri; all'aumento della polarità del lipide il massimo di emissione si sposta verso lunghezze d'onda maggiori (Kimura K *et al.*, 2004). Lo spettro di emissione corretto viene ricavato sottraendo gli spettri prima e dopo l'aggiunta del Nile Red. L'intensità di fluorescenza viene ricavata dal picco dello spettro corretto.

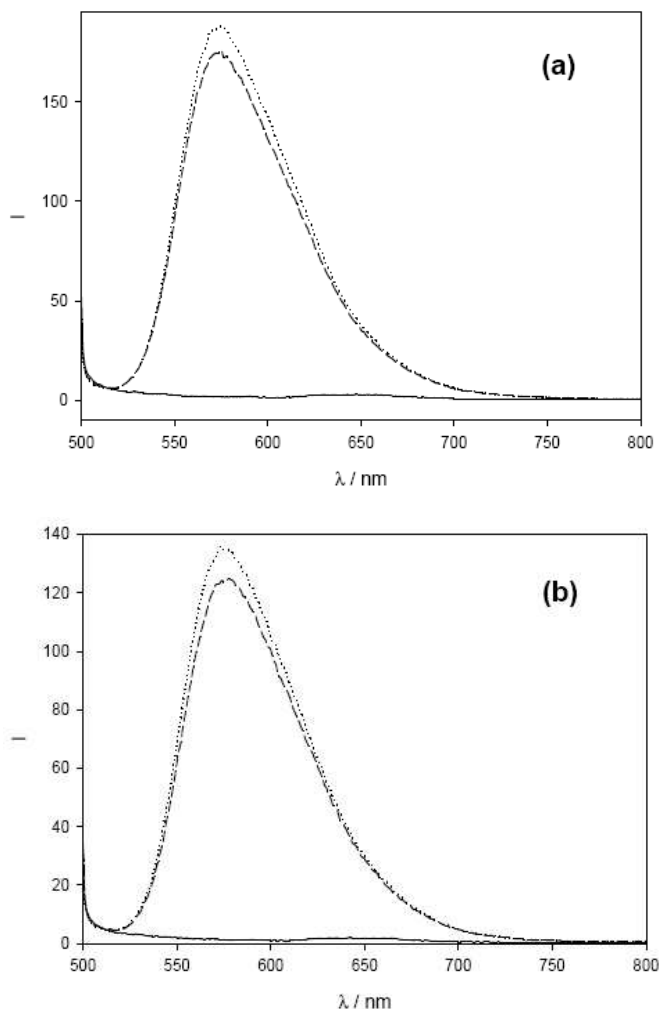


Fig.39. Confronto fra gli spettri di emissione senza NR (—), subito dopo l'aggiunta di NR (---), e dopo 5 minuti dall'aggiunta (---). *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 (a) e *Cryptococcus gilvescens* DBVPG 4722 (b).

E' stata effettuata una seconda prova, preparando soluzioni contenenti 20 µl di lievito e 2 ml di PBS, aggiungendo la stessa quantità di Nile Red. Una terza prova è stata effettuata con soluzioni contenenti 10 µl di lievito e 3 ml di PBS, sempre con la stessa concentrazione di sonda fluorescente.

Misure di assorbimento e di emissione su *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785

Sono state preparate soluzioni a differente concentrazione di lievito (5, 10, 20, 30, 40, 50 μ l in 3 ml di PBS) quindi sono stati registrati gli spettri di assorbimento delle 6 sospensioni cellulari prima e dopo l'aggiunta di 10 μ l di NR, e gli spettri di emissione eccitando a 488 nm (figura 40).

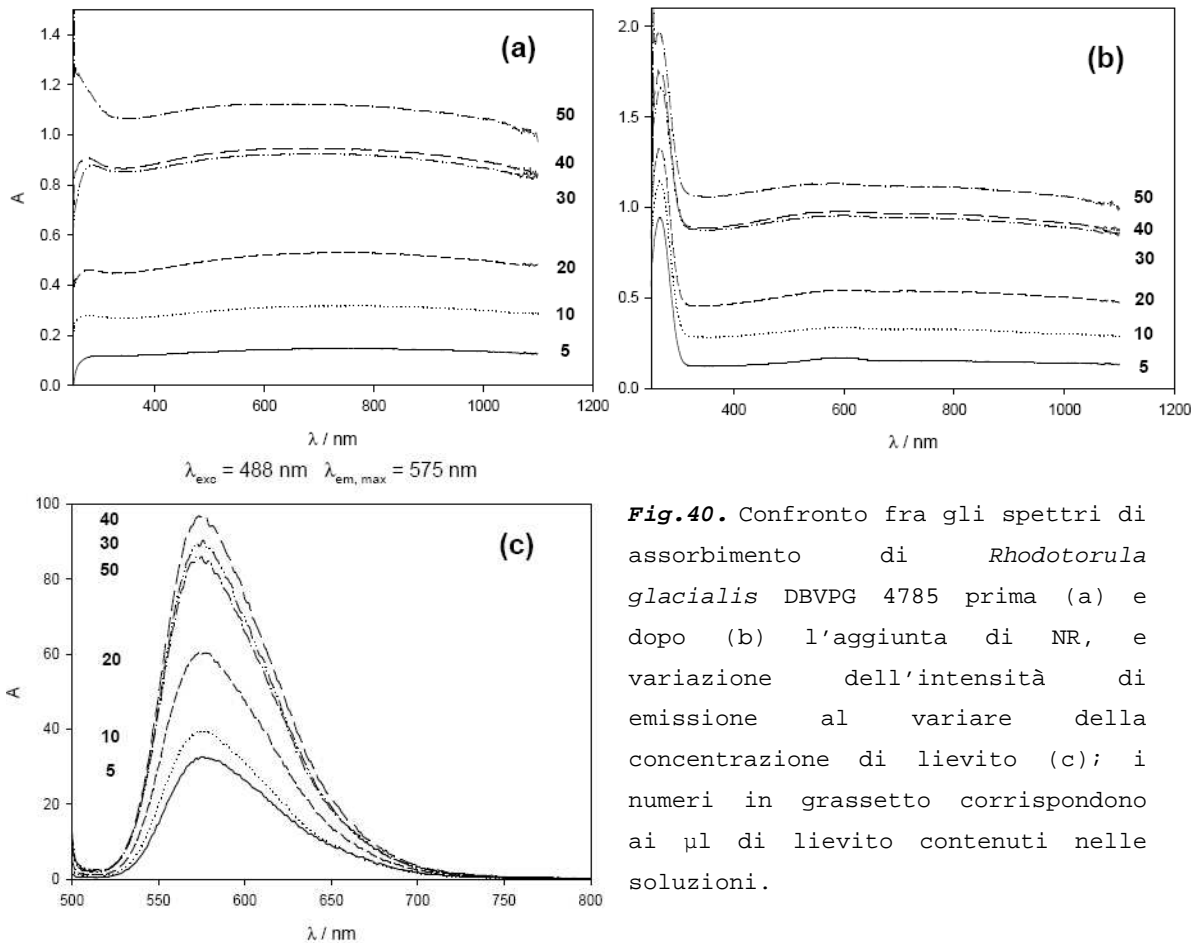


Fig.40. Confronto fra gli spettri di assorbimento di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 prima (a) e dopo (b) l'aggiunta di NR, e variazione dell'intensità di emissione al variare della concentrazione di lievito (c); i numeri in grassetto corrispondono ai μ l di lievito contenuti nelle soluzioni.

Dalle misure dei tempi di vita dello stato eccitato su questi campioni è stato possibile osservare un decadimento bi-esponenziale dello stato eccitato con $\tau^1 = 3.8$ ns e con $\tau^2 = 9.9$ ns per tutte le soluzioni.

Infine, per rendere minimi gli effetti di scattering legati alla torbidità delle soluzioni sono state effettuate misure di emissione in front-face (FF) e utilizzando questi dati è stata costruita una curva di intensità di emissione massima ($I_{em, max}$)

vs i μl di lievito ($\mu\text{l}_{\text{DBVPG 4785}}$). La relazione è mostrata in figura 41.

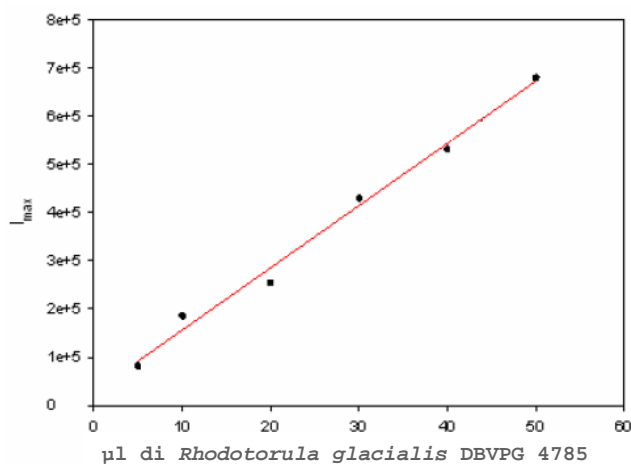


Fig.41. Dipendenza dell'intensità di emissione massima dai volumi di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785; in rosso è riportata la curva che meglio interpola i dati sperimentali ($R = 0.9954$).

Per ultimo sono state effettuate misure di anisotropia di emissione, eccitando a 488 nm, e di eccitazione, fissando la lunghezza d'onda del monocromatore di emissione a 592 nm.

Discussione

La crescita microbica è il risultato netto di un numero molto alto di reazioni enzimatiche, ciascuna condizionata da diversi fattori: la temperatura è fra i più determinanti e un'eventuale diminuzione di questo parametro condiziona esponenzialmente la velocità di qualsiasi reazione biochimica (D'Amico *et al.*, 2006; Price P *et al.*, 2004).

Detto questo, non sorprende che l'acclimatazione dei lieviti psicrofili facoltativi e dei mesofili a temperature minori di quella che è loro ottimale ne influenzi in modo decisivo la velocità specifica di crescita (μ_{\max} h⁻¹). La μ media di entrambi i gruppi di lieviti, infatti, è maggiore alla più alta delle due temperature di crescita sperimentate (18 e 30°C, rispettivamente). Per contro, sia gli psicrofili facoltativi che i mesofili presentano all'ingresso in fase stazionaria rese medie in biomassa ($Y_{X/S}$) non condizionate dalla temperatura. Tuttavia, differenze nei coefficienti di conversione dei nutrienti in biomassa sono più evidenti quando si confrontano i valori medi della $Y_{X/S}$ di tutte e tre le categorie di lieviti esaminate, psicrofili obbligati e facoltativi e mesofili, ed è probabile che risultino da diverse caratteristiche di adattamento. I risultati mostrati nel capitolo precedente riferiscono che gli psicrofili obbligati hanno le più alte rese in biomassa, seguiti dagli psicrofili facoltativi e quindi dai mesofili. E' possibile corroborare tale comportamento marcando la maggiore disponibilità di enzimi adenilico ciclasi recentemente osservata nei microorganismi psicrofili (Napolitano MJ *et al.*, 2005).

E' stato verificato che solo un numero esiguo di lieviti mesofili è capace di accumulare nella cellula alte quantità di lipidi neutri. Questi sono naturalmente impiegati nell'immagazzinamento dell'energia (Gill CO *et al.*, 1977;

Evans CT and Ratledge C, 1983; Granger LM et al., 1993; Ratledge C, 2002). Ora, la maggior parte dei lipidi neutri si presenta come triacilgliceroli e sterilsteri che, privi di carica, non possono far parte delle membrane cellulari. Essi vengono tuttavia sequestrati in particelle lipidiche idrofobiche denominate *lipids particles* LP (o *lipids bodies*) dove sono utilizzati piuttosto come "storage" di precursori utili alla sintesi delle membrane lipidiche che come vera e propria riserva di energia libera della cellula (Czabany T et al., 2007.; Daum G et al., 2007; Wagner A and G Daum, 2005; Wynn JP et al., 2001).

E' noto che quando la temperatura di sviluppo di un microrganismo, eucariote o procariote, è spostata verso valori subottimali, ciò che accade è un aumento marcato del rapporto lipidi/proteine, conseguente ad un dirottamento preferenziale del carbonio disponibile nella direzione della sintesi lipidica. A basse temperature di crescita, la maggiore disponibilità di lipidi è, infatti, necessaria per mantenere lo stato fisiologico funzionale delle membrane mentre l'evento proliferativo è più contenuto (Guschina IA and JL Harwood, 2006). I risultati ottenuti quando abbiamo valutato l'accumulo dei lipidi nelle nostre cellule di lievito, sono stati solo parzialmente coerenti con quanto appena osservato. Infatti, hanno indicato che l'acclimatazione dei mesofili dai 30 ai 18°C è certamente la causa che determina l'aumento della loro resa lipidica ($Y_{L/X}$), tuttavia non accadeva la stessa cosa negli psicrofili facoltativi, in cui pure veniva giudicata la risposta di acclimatazione dai 18 ai 4°C, notando però che, in questo caso, il contenuto di olio microbico nella cellula restava pressoché lo stesso. Infine, simili coefficienti di resa $Y_{L/X}$, sono stati osservati quando venivano confrontati gli psicrofili obbligati e facoltativi.

Tale nota non permette, quindi, di dedurre con certezza che l'accumulo dei lipidi nella cellula sia un evento capace di rispondere all'abbassamento della temperatura di crescita dei microrganismi in esame, d'altro canto non può nemmeno essere

considerato un carattere distintivo dell'adattamento dei microrganismi ad ambienti permanentemente freddi.

E' noto che l'abbassamento della temperatura causa l'irrigidimento delle membrane fosfolipidiche e che tale effetto è deleterio per la sopravvivenza della cellula. Pertanto, la necessità di una risposta che vada ad agire sulla fisiologia della membrana del microrganismo, quando questo si trova al freddo, è generalmente disciplinata dalla necessità di mantenerne la funzionalità (Los DA and N Murata, 2004; Morgan-Kiss RM *et al.*, 2006).

Per regolare la fluidità di membrana i lieviti psicrofili, facoltativi e obbligati, sfruttano diversi cambiamenti nella composizione delle membrane lipidiche. Questi consistono nell'incorporazione di acidi grassi più insaturi o a catena più corta ma anche con maggiore ramificazione, oppure ciclici (Chintalapati S *et al.*, 2004; Feller G, 2007; White PL *et al.*, 2000). L'aumento dell'insaturazione dei lipidi di membrana è fra le strategie di acclimatazione e/o di adattamento al freddo meglio studiate (Russell NJ, 1997; Guschina IA and JL Harwood, 2006; Morgan-Kiss RM *et al.*, 2006). Evidentemente la presenza di acidi grassi polinsaturi è fondamentale per il microrganismo psicrofilo che cresce a temperature anche molto basse, addirittura glaciali.

Differenze nella composizione e nel grado di insaturazione degli acidi grassi di membrana tra microrganismi psicrofili e mesofili sono già state esplorate, sotto alcuni punti di vista, a partire dal 1973 (McMurrough I and AH Rose, 1973; Arthur H and K Watson, 1976; Watson K, 1978; Watson K *et al.*, 1978). Tuttavia, non è mai stato realizzato finora uno studio comparativo esaustivo, in merito a questo argomento, che coinvolgesse diverse e numerose specie di lieviti mesofili e psicrofili.

Le analisi dei profili lipidici, risultati dai molteplici cromatogrammi registrati nel corso del nostro studio, hanno rivelato che, in ogni caso, prescindendo dalla temperatura, la somma degli acidi grassi saturi e insaturi C14 e C18 ha sempre

rappresentato più del 98% di quelli totalmente estratti, sia negli psicrofili che nei mesofili. Inoltre, hanno comprovato che non l'accumulo dei lipidi nella cellula, come inizialmente avevamo immaginato, quanto piuttosto l'aumento del grado di insaturazione degli acidi grassi disponibili sarebbe fra i maggiori meccanismi coinvolti nell'adattamento metabolico delle cellule di lievito ad ambienti permanentemente freddi.

A conferma di questo, vi è il dato che in sei dei sette ceppi di psicrofili facoltativi, l'acido linoleico (C18:2,n-6), che è l'acido grasso più insaturo prodotto da questa categoria, è più abbondante a 4°C piuttosto che a 18°C e ciò avviene a scapito dell'acido oleico (C18:1,n-9). L'attivazione dell'enzima Δ 12 desaturasi, che converte l'acido oleico nel precursore della serie degli omega-6 o acido linoleico, potrebbe essere uno dei meccanismi che, attraverso il mantenimento della fluidità della membrana lipidica, concorrono all'acclimatazione del microrganismo a basse temperature. Il maggior contenuto di acido linoleico si riflette di conseguenza nel più alto valore medio che assume l'indice di insaturazione UI nel gruppo dei facoltativi a 4°C. Tuttavia, sono gli psicrofili obbligati i più ricchi in contenuto di acidi grassi insaturi. Al loro alto indice di insaturazione contribuisce principalmente l'acido α -linolenico (C18:3,n-3), precursore della serie degli omega-3, che si forma a scapito dell'acido grasso meno insaturo di un solo doppio legame (C18:2,n-6), l'acido linoleico. Infatti, l'acido α -linolenico si recupera da tutti i ceppi di psicrofili obbligati coltivati a 4°C, nei quali può rappresentare fino al 37,3% il totale degli acidi grassi. Invece, lo stesso, è quasi del tutto assente e comunque mai superiore in contenuto al 2,8%, negli psicrofili facoltativi, anche se la temperatura di crescita di questi è la stessa degli psicrofili obbligati.

I facoltativi, di fatto, pur avendo evoluto forme genetiche di tolleranza al freddo, non si possono dire fisiologicamente specializzati quanto gli psicrofili obbligati: la notevole quantità di acido α -linolenico evoca una risposta di

adattamento che è propria degli psicrofili obbligati ed è probabilmente in relazione con l'alta attività della $\Delta 15$ desaturasi.

L'acido α -linolenico, infine, è generalmente assente in tutti i lieviti mesofili, con l'eccezione di *Kluyveromyces marxianus* L3.

Nella maggior parte dei mesofili, così come accade negli psicrofili facoltativi, l'indice di insaturazione aumenta con decisione quando diminuisce la temperatura di crescita; osservazione che è coerente con dati già pubblicati sui lieviti mesofili in merito a questo tema (McMurrough I and AH Rose, 1973; Arthur H and K Watson, 1976; Watson K, 1978; Watson K et al., 1978). Nonostante ciò, il confronto statistico fatto per campioni accoppiati all'interno della categoria o dei mesofili o degli psicrofili facoltativi, non ha confermato l'esistenza di una relazione significativa tra la temperatura di crescita e l'andamento dei valori di insaturazione. Questo risultato ha messo in dubbio che l'aumento del grado di insaturazione degli acidi grassi possa considerarsi una risposta di acclimatazione generale dei lieviti quando sono esposti a basse temperature di crescita. Tuttavia, se invece che in relazione con la variabile temperatura si analizza la variazione dell'indice medio di insaturazione di gruppi di lieviti diversi cresciuti alla stessa temperatura, allora, l'indice più alto si rivela, senza difficoltà, quello degli psicrofili obbligati, seguiti dai vicini facoltativi e da ultimi dai mesofili. Osservazione che conferma quanto la misura dell'insaturazione degli acidi grassi sia importante nell'adattamento, correlata con la capacità dei lieviti psicrofili di sopravvivere e di proliferare in ambienti glaciali.

Alcuni recenti studi hanno riportato che la risposta di adattamento di diversi organismi a temperature di crescita più basse si concretizza nella riduzione della lunghezza media della catena degli acidi grassi (Bahrndorff S et al., 2007; Chintalapati S, 2004; Guschina IA and JL Harwood, 2006).

Cambiamenti nella lunghezza dell'acido grasso, visti come conseguenza della diminuzione della temperatura di crescita, non sono stati osservati né nei mesofili né negli psicrofili facoltativi in esame in questo studio, tuttavia, è stato constatato un maggior contenuto relativo di acidi grassi più brevi nel gruppo dei mesofili piuttosto che nei lieviti psicrofili. Alla luce di ciò, è apparentemente da escludere qualsiasi ruolo degli acidi grassi a corta catena nei meccanismi di adattamento e/o di acclimatazione al freddo dei lieviti. Al contrario, sembra sia proprio la produzione di acidi grassi con una maggiore lunghezza media una caratteristica di adattamento propria dei lieviti isolati da ambienti permanentemente freddi. Da un altro punto di vista, l'allungamento della catena carboniosa deve verificarsi, poiché l'aumento di C oltre il C16 è necessario per l'introduzione di ulteriori doppi legami da parte delle desaturasi $\Delta 12$ e $\Delta 15$.

E' ben noto che, fino ad oggi, fonte quasi esclusiva di acidi grassi polinsaturi omega-3, in particolare di quelli altamente insaturi quali ARA, EPA e DHA, siano i pesci grassi. I processi di purificazione necessari per ottenere un olio di pesce di buona qualità e per eliminare il più possibile i metalli pesanti, inevitabilmente presenti nelle loro carni, sono estremamente costosi, pertanto, individuare una valida alternativa, eventualmente biotecnologica, alla produzione attuale di omega-3 e anche di omega-6, è di grande importanza. Qualora si confermassero produttori di olio microbico ad alto contenuto di acidi grassi polinsaturi, i lieviti psicrofili potrebbero risultare utili proprio per questo scopo. Tale ipotesi applicativa sarebbe una possibile concretizzazione del concetto innovativo di SCO (single cell oil) che prospetta l'uso della cellula microbica come produttrice di lipidi, fra l'altro, ipotesi anche sopportata da alcune caratteristiche che nei lieviti psicrofili si sono rivelate effettivamente in relazione con la temperatura di crescita.

E' evidente che esiste un adattamento continuo del microrganismo alle condizioni di vita esterne, sollecitato dai cambiamenti inesorabili dell'ambiente in cui vive. In merito alla temperatura di sopravvivenza, il range tollerato da un microrganismo può essere più o meno ampio e questo dipende da quanto sono estese le oscillazioni di temperatura nel suo habitat naturale. Pertanto, dopo una scala temporale di molte generazioni, gli psicrofili obbligati hanno dovuto evolvere caratteristiche fisiologiche adatte ad un habitat permanentemente freddo. I facoltativi sembrano invece essersi adattati ad ambienti non permanentemente freddi, presumibilmente caratterizzati da oscillazioni più ampie. Per questo potrebbero, forse, sconfinare in campi di applicazione comuni ai lieviti mesofili, pur distinguendosi da questi ultimi per una specializzazione biochimica e fisiologica al freddo potenzialmente applicativa. Tuttavia, sono gli psicrofili obbligati i principali oggetti di interesse laddove si vogliono studiare o utilizzare i comportamenti fisiologici che si sono definiti in condizioni di psicrofilia estrema.

I risultati riportati in questo documento sembrano tutti confermare che la classificazione nei tre gruppi A, B e C dei lieviti, fatta solo sulla base dei limiti di temperatura di sopravvivenza, sia in buon accordo con le differenze che sono state poi osservate in termini di efficienza di conversione dei nutrienti in biomassa e di composizione in acidi grassi delle frazioni lipidiche recuperate. La produzione di elevate quantità di acidi grassi polinsaturi, come l' α -linolenico, si è mostrata, per esempio, una specializzazione funzionale tipica solo degli psicrofili obbligati, ben adattati a vivere a 4°C.

Queste premesse ci hanno suggerito l'idea che se fossimo riusciti ad avviare su uno psicrofilo obbligato processi di fermentazione a temperature inferiori ai 4°C, per esempio a 0°C o anche minori, avremmo potuto forse indurre, per via dei meccanismi di acclimatazione innescati dal microrganismo, l'aumento dell'insaturazione nei già presenti precursori acido

linoleico e α -linolenico, recuperando in questo modo acidi grassi polinsaturi omega-6 e omega-3; ottimisticamente l'EPA, il DHA o l'ARA.

Con questo proposito è stato scelto un ceppo di lievito psicrofilo obbligato, *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785, che, per caratteristiche produttive e per cinetica di crescita, era fra i più appropriati per la prova di fermentazione a bassa temperatura che si voleva mettere a punto.

Rhodotorula glacialis DBVPG 4785 è in grado di accumulare lipidi quando è coltivato in eccesso di fonte di carbonio. Infatti, se in limitazione di carbonio l'accumulo dei lipidi nelle lipids particles (LP) è risultato modesto, l'utilizzo di un terreno di crescita con un rapporto C:N molto sbilanciato a favore di C (40:1) ha permesso di ottenere biomassa con un contenuto di lipidi del 44%. Tuttavia, un accumulo ancora superiore è risultato dalle prove effettuate in bioreattore, per le quali è stato definito un terreno con un rapporto C:N di 52:1. In queste condizioni, la biomassa ottenuta risultava costituita da lipidi per oltre il 50%, qualità che faceva sì fosse possibile definire il ceppo in esame di *Rhodotorula glacialis*, un lievito oleaginoso, capace di una resa di conversione del glucosio in lipidi di almeno il 25% e, analogamente ai microrganismi oleaginosi, di accumulare i lipidi prodotti nelle vescicole specializzate al termine della fase di crescita esponenziale. Infatti, sia le osservazioni microscopiche effettuate con un apposito staining delle particelle lipidiche, sia l'andamento della concentrazione cellulare e del consumo di glucosio durante le colture batch, confermavano che il ceppo accumulava lipidi quando, presumibilmente a causa di una limitazione di un componente del terreno, non si trovava più nelle condizioni di dividersi, tuttavia, continuava a metabolizzare l'eccesso di fonte di carbonio, indirizzando il nutrimento, di preferenza, verso la via di sintesi lipidica.

Queste osservazioni consentono di ipotizzare che se si utilizzasse un mezzo di coltura in maggior misura sbilanciato verso la fonte di carbonio, la quantità di questo convogliata verso la sintesi di lipidi possa aumentare ulteriormente, raggiungendo un accumulo di "olio microbico" ed una resa di conversione del glucosio ancora maggiori.

Le colture batch condotte a diverse temperature, nell'intervallo compreso tra 25 e -3°C, hanno dimostrato che *Rhodotorula glacialis* cresce abbondantemente a tutte le temperature comprese tra 20 e -3°C, presentando rese di biomassa e produzione di lipidi molto simili; tuttavia, la velocità di crescita risulta fortemente influenzata dalla temperatura. A 15°C sono stati osservati la maggiore velocità di crescita del microrganismo ($\mu = 0.050 \text{ h}^{-1}$) e tempi più rapidi di consumo del glucosio e di accumulo dei lipidi. Il fatto, fra l'altro sorprendente, che il ceppo cresca efficientemente a temperature prossime a quella ambiente, nonostante sia stato isolato da un habitat glaciale, è di grande importanza qualora si voglia provare ad impiegarlo nella produzione industriale di lipidi microbici.

La composizione degli acidi grassi delle frazioni lipidiche di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 raccolte al momento dell'esaurimento della fonte di carbonio è stata determinata, come di consueto, mediante GC-MS.

A tutte le temperature, eccezion fatta per il -3°C, è stato confermato che la somma degli acidi grassi, saturi e non, con catene lunghe 14, 16 e 18 atomi di carbonio, rappresenta più del 99% del totale recuperato. Gli acidi grassi presenti in maggiore quantità sono, in qualunque condizione, i C18, soprattutto nella forma dell'acido oleico (C18:1,n-9), tuttavia, sono pure abbondantemente rappresentati l'acido palmitico (C16:0) e l'acido linoleico (C18:2,n-6). L'acido α -linolenico (C18:3,n-3) da cui parte la sintesi endogena degli acidi grassi polinsaturi degli omega-3, è prodotto in grandi quantità solo alle temperature di 0°C e -3°C, quando raggiunge una presenza relativa del 28.3, mentre tende ad essere

prodotto sempre meno all'aumentare della temperatura (4.4% a 15°C).

L'alta percentuale di acido α -linolenico, che si realizza al diminuire della temperatura, si suppone sia a spese degli acidi grassi oleico e linoleico. Tale comportamento denota che l'enzima $\Delta 15$ desaturasi che aggiunge un doppio legame all'acido linoleico procurando l' α -linolenico, sebbene presente, non sia attivo alle alte temperature. Quindi, oltre che una forma di specializzazione propria degli psicrofili obbligati, la desaturasi $\Delta 15$ può essere considerata parte di un meccanismo di acclimatazione che ne controlla il funzionamento, attivandola solo se è utile al microrganismo, ovvero, quando con l'aumento dell'insaturazione garantisce il mantenimento della buona funzionalità di membrana anche a temperature glaciali. E' possibile che a tale meccanismo partecipino anche le desaturasi e le elongasi localizzate più a valle nella via biosintetica degli acidi grassi, dalle cui attività sono prodotti i componenti a lunga catena e/o alta insaturazione quali il C20:4 (SDA e/o ARA), il C22:0 e soprattutto il C22:6 (DHA). E' interessante notare infatti che questi acidi grassi compaiono solo alle più basse temperature sperimentate, 0 e -3°C, lo fanno, fra l'altro, in modo progressivo, aumentando il loro contenuto relativo al diminuire della temperatura.

Infine, se si considera l'andamento dell'indice di insaturazione, che riassume in un unico valore l'informazione su quanto sia insatura la frazione degli acidi grassi estratta, allora si vedrà che aumenta sempre al diminuire della temperatura, facendo intuire l'esistenza di una diretta correlazione tra l'adattamento del microrganismo a temperature di vita molto basse e il grado d'insaturazione degli acidi grassi, soprattutto localizzati nelle membrane.

La seconda parte di questa ricerca ha così permesso di approfondire ancora di più le conoscenze sulla fisiologia di un lievito psicrofilo isolato da un ambiente glaciale com'è *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. Le specializzazioni

funzionali che sono state verificate - la capacità di accumulare quantità considerevoli di lipidi producendo anche acidi grassi di alto valore nutraceutico, di mostrare alte rese in biomassa e un'oleagenicità caratteristica, anche a temperature non esclusivamente glaciali - rendono il microrganismo in esame interessante da un punto di vista industriale dato il suo potenziale utilizzo, in qualità di SCO, per la produzione di lipidi microbici di alto valore. Infine, i trigliceridi ottenuti per via fermentativa, qualora fossero prodotti con rese, costi e produttività volumetriche adeguate potrebbero, per esempio, essere utilizzati nella produzione di biodiesel sfruttando un processo di transesterificazione che li trasformi nei rispettivi metilesteri.

Fino ad oggi, la produzione microbica di ARA, EPA e DHA è stata garantita da microalghe e microfunghi, come *Cryptocodinium cohnii* e *Mortierella alpina*, ottenendo tuttavia prodotti come il DHA-SCO e l'ARA-SCO estremamente costosi perché estremamente puri, ma quasi esclusivamente destinati all'infanzia, soprattutto pretermine. Un'alternativa a queste specie microbiche, che spesso presentano disagi non di poco conto quando sono coltivate in bioreattori di grandi dimensioni, si pensi alla fragilità del micelio fungino di *Mortierella alpina* che spesso poco si confà con la necessità di aerare abbondantemente il processo in grande scala o il bisogno di illuminazione continua di alcune microalghe, è rappresentata da microrganismi di origine marina del genere *Schyzochitrium*, di cui è stata verificata la specializzazione ad accumulare, naturalmente, corpi lipidici ricchi soprattutto degli acidi grassi polinsaturi EPA e DHA (Morita et al., 2006). Si tratta, del genere microbico attualmente più impiegato per la produzione industriale fermentativa di omega-3 polinsaturi.

Nel presente studio le caratteristiche cinetiche e di produttività esibite in fermentazione da *Schyzochitrium limacinum* SR-21, sono state analizzate sperimentalmente,

mettendo a punto processi ottimizzati in agitazione, aerazione e composizione del terreno.

L'efficienza di conversione del substrato disponibile in biomassa è risultata inferiore a quella media misurata per gli psicrofili (0.33 vs 0.50 in media), mentre l'alta percentuale di lipidi accumulati nella massa microbica del microrganismo marino è eguagliata dagli psicrofili obbligati, in entrambi i casi si raggiungono valori vicini al 40%. Addirittura, *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 quando viene coltivata a 0 e a -3°C supera in oleagenicità, con valori prossimi al 50%, il microrganismo marino. Infine, se si continua questo confronto, si vedrà che l'efficienza di conversione del substrato in olio microbico è decisamente superiore in *Rhodotorula glacialis* (è convertito in lipidi circa il 25% del glucosio disponibile) laddove, *Schyzochitrium limacinum* SR-21, in questo senso, è meno efficiente (circa il 12%). Tuttavia, quest'ultimo è uno dei pochi microrganismi che, a fine fermentazione, presenta accumulata nella cellula una frazione molto alta degli acidi grassi polinsaturi EPA (circa il 18% sul totale) e DHA (fino al 3%). Ciononostante, il suo indice di insaturazione (pari a 1,54), risulta inferiore a quello di *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785 (1,61), perchè penalizzato dall'alto contenuto di acidi grassi saturi a catena corta C15 e C16 (21% e 16%, rispettivamente), che, negli psicrofili, sono invece sempre solo debolmente rappresentati (complessivamente inferiori al 20%). Per questo motivo, i costi di recupero e di purificazione dei prodotti polinsaturi di interesse diventano molto elevati e finiscono con il compromettere fortemente l'economicità del processo produttivo basato su *Schizochytrium limacinum* SR-21. Pertanto, l'interesse verso la ricerca di fonti microbiche oleaginose che siano altamente efficienti nella produzione di oli ad alto contenuto di PUFA, è sempre attuale ed appoggia ogni sforzo che sia diretto alla comprensione dei meccanismi di base biochimici e genetici che regolano l'accumulo dei lipidi nelle cellule potenzialmente produttrici, oppure, che miri a sviluppare tecnologie avanzate

di fermentazione, di recupero e di analisi dei lipidi microbici. L'obiettivo è porre l'accento sul rafforzamento del valore aggiunto del prodotto.

L'ultima parte di questo lavoro, per la verità ancora in itinere, è volta ad ottimizzare quelle procedure convenzionali di estrazione, di purificazione, di concentrazione e di determinazione dei lipidi microbici che richiedono, normalmente, numerosi passaggi e lunghi tempi di analisi. L'obiettivo era rendere queste fasi più veloci ed efficienti e le misure riproducibili.

I primi dati raccolti, fornendo informazioni preziose, hanno appoggiato la scelta di impiegare quale metodo di elezione, per la determinazione e la quantificazione dei lipidi in campioni biologici, la spettroscopia di fluorescenza.

La spettroscopia di fluorescenza è un metodo veloce soprattutto se confrontato con la gascromatografia, inoltre non richiede steps aggiuntivi per la preparazione del campione che viene utilizzato tal quale.

Fra l'enorme quantità di coloranti organici è stato scelto il Nile Red, poiché da' fluorescenza solo in presenza di sostanze lipidiche ed il colore della luce emessa varia a seconda dell'idrofobicità del proprio intorno.

La scelta degli standard lipidici, sui quali il metodo di misura è stato messo a punto, è stata condotta in base al principio di simulazione del sistema biologico, utilizzando cioè quei lipidi che fossero i più rappresentati nei campioni di lievito ai quali il metodo stesso doveva essere destinato. L'analisi dei dati di fluorescenza misurata su questi standard, ha offerto risultati confortanti per quanto riguarda la linearità fra l'intensità di risposta e l'aumentare della concentrazione di sostanza "grassa" via via aggiunta nella sospensione analizzata. A dire il vero, l'intensità di risposta di fluorescenza variava anche con il variare della natura dello standard. Questi risultati sono consistenti con quanto pubblicato da Kimura (Kimura et al., 2004), che

asserisce che la misura di fluorescenza del Nile Red varia anche in funzione del tipo di lipide con cui la sonda interagisce. Il massimo di emissione del Nile Red con lipidi neutri (acido stearico $\lambda=608$ nm, acido linoleico $\lambda=630$ nm, acido linolenico $\lambda=631$ nm) si trova, infatti, ad una lunghezza d'onda più corta del massimo di emissione che si ha in presenza di lipidi polari (fosfatidilcolina $\lambda=638$ nm); tale intensità di emissione è, per altro, risultata più alta quando il Nile Red interagisce con lipidi neutri piuttosto che polari, a parità di condizioni sperimentali. Infine si osserva uno spostamento del massimo di emissione dei campioni del medesimo lipide all'aumentare della concentrazione dello stesso.

Queste misure sperimentali ci hanno suggerito che parametri di fluorescenza quali intensità di emissione e lunghezza d'onda del suo massimo, possono spostarsi in funzione della concentrazione, dell'intorno e della natura del lipide con cui la sonda fluorescente interagisce.

Se comprese e combinate opportunamente fra loro e con quelle di altre tecniche di spettroscopia, queste misure possono rappresentare l'alternativa veloce per la quantificazione e il riconoscimento dei lipidi presenti in un sistema biologico, anche complesso, come le cellule di lievito di nostro interesse. Ad incoraggiare tali prospettive hanno contribuito i risultati degli spettri di anisotropia di emissione, che hanno dato valori sempre differenti da zero, a conferma che il Nile Red interagisce effettivamente con i corpi lipidici presenti nelle cellule. Queste misure, aderenti alle previsioni, mostrano come aumentando la concentrazione di lipide aumenta anche l'anisotropia dei campioni esaminati, tuttavia non possono essere utilizzate nel discriminare fra un lipide ed un altro dal momento che sono risultate sempre molto simili fra loro. La proprietà fotofisica che può invece essere sfruttata per distinguere un tipo di lipide da un altro è il tempo di vita dello stato eccitato del Nile Red, che, misurato in ogni diversa condizione sperimentale, variava a seconda

dell'intorno chimico definito dagli standard, mostrando andamenti sempre molto precisi e riconducibili chiaramente alla polarità dell'acido grasso in esame.

Attualmente si stanno sperimentando queste proprietà fotofisiche su diverse sospensioni cellulari preparate con il ceppo di lievito psicrofilo *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785. I dati esaminati fino ad oggi sono da giudicare con positività. Anzitutto, gli spettri di emissione registrati hanno sempre mostrato massimi molto spostati verso il blu, evento che conferma la presenza di 'domini' molto idrofobici nella cellula. Il metodo si è inoltre mostrato sensibile al diverso contenuto di lipidi presenti nei campioni di volta in volta esaminati, infatti è risultata più che evidente la dipendenza lineare fra l'intensità di luce emessa dal fluoroforo e la concentrazione di cellule in sospensione. I valori sui tempi di vita infine, sebbene siano stati quelli di più difficile interpretazione perché molto alti (10 ns) e mai verificati sugli standard, provano, interpretati assieme ai dati di anisotropia di emissione, l'effettiva intercalazione del Nile Red nei corpi lipidici della cellula.

Nonostante alcuni problemi, che saranno affrontati nel prosieguo della ricerca, e che sono da riferirsi soprattutto alla torbidità dei campioni di lievito, i dati ottenuti incoraggiano lo sforzo di mettere a punto un metodo spettrofluorimetrico semplice e veloce destinato alla misura e all'identificazione dei lipidi presenti in matrici biologiche molto complesse e che risponda alle aspettative con le quali parte di questo lavoro di ricerca è stato intrapreso.

Conclusioni

Questa ricerca è nata con lo scopo di sperimentare nuove vie microbiche di produzione degli acidi grassi polinsaturi omega-3 ed omega-6, da proporre quali alternative all'unica vera fonte che attualmente assicura disponibilità di tali sostanze, seppur non più certa ed adeguata: l'olio di pesce.

La continua scoperta degli effetti benefici, preventivi e terapeutici che alcuni PUFA, in particolare, avrebbero in molteplici patologie, seguita dalle sempre nuove raccomandazioni che Organizzazioni Scientifiche Internazionali presentano in merito alla necessità di integrare la dieta con tali sostanze, alimentano un vivo interesse verso la ricerca di nuove fonti efficienti di produzione degli acidi grassi polinsaturi.

La possibilità di disporre di ceppi di lieviti psicrofili nuovi e mai esplorati prima, ci sembrava ideale per verificare la tesi secondo cui l'accumulo di acidi grassi altamente insaturi nelle membrane dei microrganismi e nei loro corpi lipidici è fra i principali meccanismi attraverso cui si attua l'adattamento e l'acclimatazione degli stessi a condizioni estreme di temperatura.

I risultati riportati in questo documento sembrano tutti voler confermare che la classificazione dei lieviti in psicrofili obbligati e facoltativi e in mesofili, fatta sulla base dei limiti di temperatura di sopravvivenza, è in buon accordo con le differenze che sono state poi verificate nell'efficienza di conversione dei nutrienti in biomassa e nella composizione in acidi grassi delle frazioni lipidiche di volta in volta recuperate. I primi dati di screening hanno provato che sono proprio le cellule di lievito psicrofile obbligate, ovvero quelle con maggiore specializzazione biochimica e fisiologica per ambienti glaciali, a mostrare il più alto contenuto di acidi grassi polinsaturi: in particolare si mostravano le più

ricche in acido α -linolenico (C18:3,n-3), precursore di tutta la serie degli omega-3. Prove successive di acclimatazione messe a punto in bioreattore su un ceppo opportunamente selezionato di psicrofilo obbligato, *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785, coltivato a -3°C , ben sotto la temperatura ottimale di crescita, hanno rivelato la possibilità di arricchire sensibilmente la cellula nella sua componente polinsatura. In particolare, aumentava il contenuto relativo di acido α -linolenico (da 4.4% a 15°C al 28% a -3°C), ed inoltre, agendo presumibilmente sulle desaturasi ed elongasi responsabili, veniva indotta la sintesi degli omega-3/6 a lunga catena ed elevato grado di insaturazione, quali il C20:4 (SDA e/o ARA) il C22:0 e perfino il C22:6 (DHA), mai rinvenuti in nessun ceppo di lievito a temperature superiori a 0°C .

Tali comportamenti possono essere interpretati come esplicitazioni funzionali di un adattamento all'ambiente esterno evoluto dagli psicrofilo, soprattutto dagli obbligati, e confermano che il grado di insaturazione degli acidi grassi è uno dei modi attraverso cui si esplica la capacità della cellula psicrofila di vivere a temperature glaciali.

Il fatto che i lieviti psicrofilo accumulino naturalmente, in compartimenti specializzati, quantità considerevoli di lipidi (con valori prossimi al 50% sul peso della biomassa) e la possibilità di migliorare la loro oleagenicità in risposta a variazioni di temperatura dell'ambiente esterno, mantenendo sempre rese in biomassa estremamente elevate, rendono questo gruppo di microrganismi interessanti anche da un punto di vista industriale, sottintendendo un loro potenziale utilizzo per la produzione di lipidi microbici.

Finora le uniche cellule microbiche in grado di produrre per via fermentativa acidi grassi polinsaturi di elevato valore nutraceutico, sono state microalghe e microfunghi come *Cryptocodium cohnii* e *Mortierella alpina*, tuttavia, non si tratta di cellule capaci di offrire le stesse ottime qualità fermentative e produttive proprie dei lieviti.

Il lavoro presentato si è via via definito, nel corso di tre anni di studio, trovando ispirazione da argomenti diversi. Inizialmente sospinto dall'interesse a ricercare fonti microbiche oleaginose utili alla produzione degli acidi grassi polinsaturi poco rappresentati negli alimenti convenzionali, ha poi messo in luce specializzazioni tali delle cellule psicrofile esaminate da suggerire anche un loro eventuale utilizzo per la produzione di biodiesel, sfruttando in questo senso i trigliceridi prodotti per via fermentativa.

Al di là di un possibile e valutabile fine applicativo, che rimane tuttavia un'evoluzione secondaria dello studio, senza dubbio, gli sforzi fatti hanno contribuito ad apportare nuove conoscenze sulla fisiologia dei lieviti psicrofili che, ancora oggi, restano una fonte poco esplorata di biodiversità.

BIBLIOGRAFIA

- Abyzov SS** (1993) Microorganisms in the Antarctic ice. Antarctic Microbiology (Friedmann EI, ed), pp. 265-295. Wiley & Sons Inc, Publisher, New York.
- Albert CM**, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PM, Manson JE, Willett WC (2002) Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N Engl J Med* 346:1113-8.
- Albert CM**, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Ajani UA, Carey VJ, Willett WC (1998) Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA* 279:23-8.
- Amaretti A**, Cordisco L, Raimondi S, Rossi M, Buzzini P, Matteuzzi D (2008) Growth parameters and lipid production by psychrophilic yeasts. ATTI 11th International Conference on Industrial Biotechnology IBIC 8-11 June, Napoli.
- Amaretti A**, Cordisco L, Raimondi S, Turchetti B, Pagnoni UM, Matteuzzi D, Rossi M (2008) Growth parameters of obligate and facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. ATTI X Annual Congress FISV 24-27 Settembre, Riva Del Garda (TN).
- Amaretti A**, Cordisco L, Raimondi S, Leopardi A, Buzzoni P, Pagnoni UM, Rossi M (2008) Adaptation and acclimation to diverse temperatures of obligate and facultative psychrophilic and mesophilic yeasts. ATTI X Annual Congress FISV 24-27 Settembre, Riva Del Garda (TN).
- American Heart Association Nutrition Committee** (2002) Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Circulation* 106:2747-2757.
- Ando M**, Sanaka T, Nihei H (1999) Eicosapentaenoic acid reduces plasma levels of remnant lipoproteins and prevents in vivo peroxidation in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 10:2177-84.
- Arthur H** and Watson K (1976) Thermal Adaptation in Yeast: Growth Temperatures, Membrane Lipid, and Cytochrome Composition of Psychrophilic, Mesophilic, and Thermophilic Yeasts. *J Bacteriol* 128:56-68.
- Bahrndorff S**, Petersen SO, Loeschcke V, Overgaard J and Holmstrup M (2007) Differences in cold and drought tolerance of high arctic and sub-arctic populations of *Megaphorura arctica* Tullberg 1876 (Onychiuridae: Collembola). *Cryobiology* 55:315-323.
- Bhatia M**, Sharp M & Foght J (2006) Distinct bacterial communities exist beneath a high Arctic polythermal glacier. *Appl Environ Microbiol* 72:5838-5845.
- Billman GE**, Kang JX, Leaf A (1999) Prevention of sudden cardiac death by dietary pure omega-3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Circulation* 99:2452-7.
- Bonaa KH**, Bjerve KS, Straume B, Gram IT, Thelle D (1990) Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on blood pressure in hypertension: a population based intervention trial from the Tromso Study. *N Engl J Med* 322:795-801.
- Bucher HC**, Hengstler P, Sdiindler C, Meier G (2002) N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a metaanalysis of randomized controlled trials. *Am J Med* 112:298-308.
- Butinar L**, Spencer-Martins I & Gunde-Cimerman N (2007) Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. *Antony van Leeuwenhoek* 91:277-289.

Buzzini P (2001) Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis*-*Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup. *J Appl Microbiol* 90:843-847.

Buzzini P and **Martini A** (2002) Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J Appl Microbiol* 93:1020-1025.

Buzzini P, **Turchetti B**, **Diolaiuti G**, **D'Agata C**, **Martini A** and **Smiraglia C** (2005) Culturable yeasts in meltwaters draining from two glaciers in the Italian Alps. *Ann Glaciol* 40:119-122.

Calon F, **Lim GP**, **Yang F**, **Morihara T**, **Teter B**, **Ubeda O** (2004) Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurol* 43:633-45.

Caramia G (2007) Gli acidi grassi omega-3 ed omega-6: supplementazione indispensabile? *Ostia XXIV incontro pediatrico*.

Cavicchioli R & Tortsen T (2000) Extremophilic. *Encyclopaedia of Microbiology* (Lederberg J, ed), pp. 317-337. Academic, San Diego.

Chintalapati S, **Kiran MD** and **Shivaji S** (2004) Role of Membrane Lipid Fatty Acid in Cold Adaptation. *Cell Mol Biol* 50:631-642.

Christensen JH, **Skou HA**, **Fog L**, **Hansen V**, **Vesterlund T**, **Dyerberg J** (2001) Marine n-3 fatty acids, wine intake, and heart rate variability in patients referred for coronary angiography. *Circulation* 103:651-7.

Christner BC, **Mosley-Thompson E**, **Thompson LG**, **Zagorodnov V**, **Sandman K** and **Reeve JN** (2000) Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. *Icarus* 144:479-485.

Cohen Z, **Ratledge C** (2005) *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign IL, USA, pp. 53-72.

Cole TA, **Fok AK**, **Ueno MS**, **Allen RD** (1990) *Eur J Protistol.* 25:361-368.

Collins T, **Read MA**, **Neish AS**, **Whitley MZ**, **Thanos D**, **Maniatis T** (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-KB and cytokine inducible enhancers. *FASEB J* 9:899-909.

Cordisco L, **Ponzoni C**, **Forti L**, **Rossi M**, **Turchetti B**, **Buzzini P**, **Matteuzzi D** (2007) Adaptation of yeasts to cold environments: fatty acids profile in psychrophilic strains. *ATTI IX Annual Congress FISV 26-29 Settembre, Riva Del Garda (TN)*.

Cowan DA and **Tow LA** (2004) Endangered antarctic environments. *Annu Rev Microbiol* 58:649-90. Review.

Czabany T, **Athenstaedt K**, **Daum G** (2007) Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochimica et biophysica acta* 1771(3):299-309.

D'Amico S, **Collins T**, **Marx JC**, **Feller G** and **Gerday C** (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep* 7:385-389.

Das UN (2002) *A Perinatal Strategy for Preventing Adult Diseases: The Role of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids*. Kluwer, Boston.

Das UN (2006) Biological Significance of Essential Fatty Acids. *J Assoc Physicians India* 54:309-19.

Daum G, **Wagner A**, **Czabany T** and **Athenstaedt K** (2007) Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. *Biochimie* 89:243-248.

De Caterina R, **Cybulsky MA**, **Clinton SK**, **Gimbrone MA Jr**, **Libby P** (1995) Omega-3 fatty acids and endothelial leukocyte adhesion molecules. *Prostagl Leukotr Ess Fatty Acids* 52:191-5.

De Garcia V, **Brizzio S**, **Libkind D**, **Buzzini P** & **van Broock M** (2007) Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia (Argentina). *FEMS Microbiol Ecol* 59:331-341.

De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 79:779-85.

Deming WJ (2002) Psychrophiles and polar regions. *Curr Opin Microbiol* 5:301-309.

Evans CT and Ratledge C (1983) A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids* 18:623-629.

Evans CT and Ratledge C (1983) Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. *Lipids* 18:630-635.

Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G and Statzell-Tallman A (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunits rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1351-1371.

Feller G (2007) Life at low temperatures: is disorder the driving force? *Extremophiles* 11:211-216.

Foght J, Aislabie J, Turner S, Brown CE, Ryburn J, Saul DJ & Lawson W (2004) Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two southern hemisphere glaciers. *Microb Ecol* 47:329-340.

Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509.

Gadanhó M & Sampaio JP (2002) Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *R. glutinis* sensu stricto and *R. dairensis* comb. nov. *FEMS Yeast Res* 2:47-58.

Gill CO, Hall MJ and Ratledge C (1977) Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 33:231-239.

Gostinc̆ar C, Urs̆ic̆ V, De Hoog S & Gunde-Cimerman N (2006) Local evolution of black yeast *A. pullulans* in subglacial Arctic ice. *Proc Int Conf Alpine Polar Microbiol, Innsbruck, Austria* 19:27-31.

Gounot AM (1976) Effects of temperature on the growth of psychrophilic bacteria from glaciers. *Can J Microbiol* 22:839-846.

Granger LM, Perlot P, Goma G and Pareilleux A (1993) Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeasts: Prediction of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by a simple method. *Biotechnol Bioeng* 42:1151-1156.

Gunde-Cimerman N, Sonjak S, Zalar P, Frisvad JC, Diderichsen B & Plemenitas̆ A (2003) Extremophilic fungi in Arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Phys Chem Earth* 28:1273-1278.

Guschina IA and Harwood JL (2006) Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms. *FEBS Lett* 580:5477-5483.

Harris WS (1997) N-3 fatty acids and serum lipoproteins; human studies. *Am J Clin Nutr* 65(5 Suppl):1645-54.

Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, Sugioka K, Yamasaki H, Fujii Y (2002) Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem* 81:1084-91.

Health Council of the Netherlands (2006) Guidelines for a healthy diet. The Hague: Health Council of the Netherlands; publication no 2006/21E

Honda D, Yokochi T, Nakahara T, Erata M, Higashihara T (1998) *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean. *Mycol Res* 102 (4):439-448.

Hu FB, Cho E, Rexrode KM, Albert CM, Manson JE (2002) Fish and omega 3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *JAMA* 287:1815-21.

- Hunt DT & Wilson A** (1986) *The Chemical Analysis of Water*, 2nd edn. Royal Society of Chemistry Publishing, London.
- Yarrow D** (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. *The Yeasts. A Taxonomic Study* (Kurtzman CP & Fell JW, eds), pp. 77-100. Elsevier, Amsterdam.
- Keating TA** and Walsh CT (1999) Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 3:598-606.
- Kiy T**, Rusing M, Fabritius D (2005) Production of docosahexaenoic acid (DHA) by the marine microalga, *Ulkenia* sp, in: Cohen Z, Ratledge C (Eds.), *Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, 2005.
- Kimura K**, Yamaoka M, Kamisaka Y (2004) Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of Microbiological Methods* 56:331-338.
- Kyle DJ**, Sicotte VJ, Singer JJ, Reeb SE (1992) Bioproduction of docosahexaenoic acid (DHA) by microalgae, in: Kyle DJ, Ratledge C (Eds.), *Industrial Applications of Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp. 287-300.
- La Rovere MT**, Bigger JT Jr, Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ (1998) Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet* 351:478-84.
- Leaf A**, Xiao YF, Kang JX (2002) Interactions of n-3 fatty acids with ion channels in excitable tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 67:113-20.
- Libkind D**, Brizzio S, Ruffini A, Gadanho M, van Broock M and Paulo Sampaio J (2003) Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antony van Leeuwenhoek* 84:313-322.
- Lopez-Garcia E**, Schultze MB, Meigs JB, Manson JE, Rifai N, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB (2005) Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *J Nutr* 135:562-6.
- Los DA** and Murata N (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta* 1666:142-157.
- Ma LJ**, Catranis CM, Starmer WT & Rogers SO (1999) Revival and characterization of fungi from ancient polar ice. *Mycologist* 13:70-73.
- Ma LJ**, Rogers SO, Catranis CM & Starmer WT (2000) Detection and characterization of ancient fungi entrapped in glacial ice. *Mycologia* 92:286-295.
- Mader HM**, Pettitt ME, Wadham JL, Wolff EW & Parkes RJ (2006) Subsurface ice as a microbial habitat. *Geology* 34:169-172.
- Marangoni F**, Martiello A, Galli C (2007) Dietary fat intake of European countries in the Mediterranean area: an update. *World Rev Nutr Diet* 97:67-84.
- Marchioli R**, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D, Di Mascio R et al (2002) GISSI-Prevenzione Investigators. Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* 105:1897-903.
- Marchioli R**, Schweiger C, Tavazzi L, Valagussa F (2001) Efficacy of n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: results of GISSI Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico. *Lipids* 36(Suppl):S119-26.

- Margesin R**, Zacke G & Schinner F (2002) Characterization of heterotrophic microorganisms in alpine glacier cryoconite. *Arctic Antarctic Alpine Res* 34:88-93.
- Martin CE**, Oh CS and Jiang Y (2007) Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1771:271-285.
- McMurrough I** and Rose AH (1973) Effects of temperature variation on the fatty acid composition of a psychrophilic *Candida* species. *J Bacteriol* 114:451-452.
- Merlanti F**, Pavan M, Urbini S & Smiraglia C (1995) Prospezione sismica a riflessione sul Ghiacciaio dei Forni (Alpi Lombarde, Gruppo del Cevedale). Proc 14th Meet Gruppo Naz Geofisica della Terra Solida, Rome, Italy. 23-25 October 1995, pp. 639-642.
- Metz JG**, Roessler P, Facciotti D, Levering C, Dittrich F, Lassner M, Valentie R, Lardizabal K, Domergue F, Yamada A, Yazawa K, Knauf V, Browse J (2001) Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* 293:290-293.
- Miao X**, Wu Q (2006) Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Technol* 97(6):841-6
- Morgan-Kiss RM**, Priscu JC, Pocock T, Gudynaite-Savitch L and Huner NP (2006) Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:222-252.
- Mori TA**, Beilin LJ (2001) Long-chain omega-3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction. *Curr Opin Lipidol* 12:11-7.
- Morita E**, Kumon Y, Nakahara T, Kagiwada S, Noguchi T (2006) Docosahexaenoic acid production and lipid-body formation in *Schizochytrium limacinum* SR21. *Mar Biotechnol* 8(3):319-327.
- Morris DH** (2006) Omega-3 fats in flax and fish are similar in many ways. Flax Council of Canada, 465-167 Lombard Ave, Winnipeg, MB, Canada R3B 0T6, E-mail: flax@flaxcouncil.ca Website: www.flaxcouncil.ca
- Morrison WR** and LM Smith (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride methanol. *J Lipid Res* 5:600-608.
- Mozaffarian D**, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, Rimm EB (2004) Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr* 79:606-12.
- Mudroch A**, Azcue JM & Mudroch P (1996) Physico-chemical analysis of aquatic sediments. CRC Press Inc, Boca Raton, FL.
- Nakagawa Y**, Sakumoto N, Kaneko Y and Harashima S (2002) Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 291:707-713.
- Napolitano MJ** and Shain DH (2005) Distinctions in adenylate metabolism among organisms inhabiting temperature extremes. *Extremophiles* 9:93-98.
- Nordoy A**, Bonna KH, Sandset PM, Hansen JB, Nilsen H (2000) Effect of omega-3 fatty acids and simvastatin on hemostatic risk factors and post-prandial hyperlipidemia in patients with combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 20:259-65.
- Ollis TE**, Meyer BJ, Howe PR (1999) Australian food sources and intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Ann Nutr Metab* 43:346-355.
- Pavan M**, Diolaiuti G, Maggi V, Smiraglia C & D'Agata C (2000) Prospezioni geofisiche sul Ghiacciaio dello Sforzellina (Alpi

Lombarde, Gruppo Ortles-Cevedale). Risultati preliminari. *Neve Valanghe* 41:6-13.

Peet M, Edwards RW (1998) Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients. *J Affect Disord* 48:149-55.

Penny M, Kris-Etherton PM, Harris WS, Lawrence J (2002) Appel for Nutrition Committee. Fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106:2747-57.

Poglazova MN, Mitskevich IN, Abyzov SS & Ivanov MV (2001) Microbiological characterization of the accreted ice of subglacial lake Vostok, Antarctica. *Microb* 70: 838-846.

Price PB and Sowers T (2004) Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4631-4636.

Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, Bossaert L, Breithardt G, Brugada P (2002) Task force on Sudden Cardiac Death, European Society of Cardiology. *Europace* 4:3-18.

PUFA News1 (2003) Collected recommendations for LC-PUFA intake. <http://www.fatsoflife.com/article.asp?i=1&id=142>. Accessed November 1, 2004 88.

Qiu X, Hong H, MacKenzie SL (2001) Identification of a $\Delta 4$ fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. *The Journal of Biological Chemistry* 276(34):31561-31566.

Qiu X (2003) Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4,7,10,13,16,19): two distinct pathways. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 68:181-186.

Raspor P and Zupan J (2006) Yeasts in extreme environments. *The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (Peter G & Rosa C, eds), pp. 371-417. Springer-Verlag, Berlin.

Ratledge C (2002) Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society transactions* 30(Pt 6):1047-50.

Ratledge C (2004) Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86(11):807-15.

Ratledge C and Tan KH (1990) Oils and fats: Production, degradation and utilisation by yeasts. In: Verachtert H and De Mot R, Editors, *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, Marcel Dekker Inc, New York, pp. 225-245.

Ratledge C (2005) Microbial production of α -linolenic acid, in: Akoh C (Ed.), *CRC Handbook of Functional Lipids*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Reeve JN, Christner BC, Kvitko BH, Mosley-Thompson E and Thompson LG (2002) Life in glacial ice. *Proc 4th Int Congr Extremophiles*, Naples, Italy. 22-26 September.

Rogers SO, Theraisnathan V, Ma LJ, Zhao Y, Zhang G, Shin SG, Castello JD and Starmer WT (2004) Comparison of protocols for decontamination of environmental ice samples for biological and molecular examination. *Appl Environ Microbiol* 70:2540-2544.

Ross R (1993) Pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-9.

Rossi M, Buzzini P, Cordisco L, Amaretti A, Sala M, Raimondi S, Ponzoni C, Pagnoni UM, Matteuzzi D. Adaptation and acclimation to diverse temperatures of obligate psychrophilic, facultative psychrophilic and mesophilic yeasts. 2009 submitted.

Russell NJ (1997) Psychrophilic bacteria: molecular adaptations of membrane lipids. *Comp Biochem Physiol* 118:489-493.

- Rustan AC**, Nenaseter MS, Drevon CA (1997) Omega-3 and omega-6 fatty acids in the insuline resistance syndrome. *Ann NY Acad Sci* 827:310-26.
- Sampaio JP**, Gadanho M, Santos S, Duarte F, Pais C, Fonseca A and Fell JW (2001) Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 687-697
- Scientific Advisory Committee on Nutrition** (2004) Advice to FSA: on the benefits of oily fish and fish oil consumption from SACN. HMSO LONDON.
- Sharp M**, Parkes J, Cragg B, Fairchild IJ, Lamb H & Tranter M (1999) Widespread bacterial populations at glacier beds and their relationships to rock weathering and carbon cycling. *Geology* 27:107-110.
- Simopoulos AP** (2006) Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother* 60(9):502-507.
- Singh RB**, Niaz MA, Sharma JP, Kumar R, Rastogi V, Moshiri M (1997) Randomized, double-blind, placebo controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival. *Cardiovasc Drugs Ther* 11:485-91.
- Skidmore M**, Anderson SP, Sharp M, Foght J & Lanoil BD (2005) Comparison of microbial community composition of two subglacial environments reveals a possible role for microbes in chemical weathering processes. *Appl Environ Microbiol* 71:6986-6997.
- Skidmore M**, Foght JM and Sharp MJ (2000) Microbial life beneath a high arctic glacier. *Appl Environ Microbiol* 66: 3214-3220.
- Stam W** (2003) Communicating benefits to health professional then came's going. *AgroFood Industry hi-tech. Anno* 14, 3:14-17.
- Stillwell W**, Wassallb SR (2003) Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 126:1-27.
- Stukey JE**, McDonough VM and Martin CE (1989) Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 264:16537-16544.
- Suzukawa M**, Abbey M, Howe PR, Nestel PJ (1995) Effects of fish oil fatty acids on low density lipoprotein size, oxidability, and uptake by macrophages. *J Lipid Res* 36:473-84.
- Thakur MS**, Prapulla SG and Karanth NG (1989) Estimation of Intracellular Lipids by the Measurement of Absorbance of Yeast Cells Stained with Sudan Black. *Enzyme Microb Technol* 11:252-254.
- Thies F**, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP et al. (2003) Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet* 361:477-85.
- Thomas DN** and Dieckmann GS (2002) Antarctic Sea Ice a Habitat for Extremophiles. *Science* 25 January 295 n°5555, pp.641-644.
- Totani N**, Someya K, Oba K (1992) Industrial production of arachidonic acid by *Mortierella*, in: Kyle DJ, Ratledge C (Eds.), *Industrial Applications of Single Cell Oils*, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp.52-60.
- Turchetti B**, Buzzini P, Goretti M, Branda E, Diolaiuti G, D'Agata C, Smiraglia C, Vaughan-Martini A (2008) Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *FEMS Microbiol Ecol* 63(1):73-83.
- Van de Werf F**, Ardissino D, Betriu A, Cokkinos DV, Falk E, Fox KAA et al. (2003) Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the

Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. Eur Heart J 24:28-66.

Wagner A and Daum G (2005) Formation and mobilization of neutral lipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Soc Trans 33:1174-1177.

Watson K (1978) Thermal adaptation in yeasts: correlation of substrate transport with membrane lipid composition in psychrophilic and thermotolerant yeasts. Biochem Soc Trans 6:293-296.

Watson K and Arthur H (1976) *Leucosporidium* yeasts: obligate psychrophiles which alter membrane-lipid and cytochrome composition with temperature. J Gen Microbiol 97:11-8.

Watson K, Morton H, Arthur H and Streamer M (1978) Membrane lipid composition: a determinant of anaerobic growth and petite formation in psychrophilic and psychrophobic yeasts. Biochem Soc Trans 6:380-381.

White PL, Wynn-Williams DD and Russell NJ (2000) Diversity of thermal responses of lipid composition in the membranes of the dominant culturable members of an Antarctic fellfield soil bacterial community. Antarc Sci 12:386-393.

Wynn JP, Hamid AA, Li Y and Ratledge C (2001) Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. Microbiology 147:2857-2864.

Xue F, Zhang X, Luo H, Tan T (2006) A new method for preparing raw material for biodiesel production. Proc Biochem 41:1699-1702.

